



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE PHA POMOCÍ  
VYBRANÝCH BAKTERIÁLNÍCH ISOLÁTŮ**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF PHA BY SELECTED BACTERIAL ISOLATES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Filip Matějka

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

**BRNO 2020**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1525/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Filip Matějka**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Biotechnologická produkce PHA pomocí vybraných bakteriálních isolátů

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Metabolická charakterizace vybraných isolátů schopných produkce PHA
3. Posouzení produkčních schopností vybraných isolátů

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Filip Matějka  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce pojednává o produkci polyhydroxyalkanoátů (PHA) za využití termofilních bakteriálních izolátů s označením 34, 35 a BŽ. Bakteriální mikroorganismy pocházejí z aktivovaného kalu a kompostu. Teoretická část práce obsahuje popis PHA, extremofilních bakterií a detekčních technik pro stanovení polyhydroxyalkanoátů. V experimentální části byla nejprve pomocí PCR stanovena přítomnost *phaC* genu, který je klíčový pro schopnost produkce PHA a bakteriální kmeny byly také podrobeny sekvenací genu *16S rRNA* za účelem jejich taxonomické klasifikace. V další části experimentální práce došlo k optimalizaci podmínek pro nárůst biomasy a produkci PHA. Postupně byly identifikovány vhodného zdroje uhlíku, ideální kultivační teplota a taktéž byl sledován vliv prekurzorů na produkci kopolymerů. Složení a podíl PHA byl stanoven pomocí GC-FID a na závěr proběhl vizuální screening akumulace PHA uvnitř bakteriálních buněk za pomoci fluorescenční mikroskopie.

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using thermophilic bacterial isolates with designation 34, 35 and BŽ. Bacterial strains were isolated from activated sludge and compost. The theoretical part contains a description of PHA, extremophilic bacteria and detection techniques for the determination of polyhydroxyalkanoates. In the experimental part, the presence of the *phaC* gene, which is crucial for the ability to produce PHA, was first determined by PCR and bacterial strains were also subjected to DNA sequencing of 16S rRNA gene which enabled preliminary taxonomical classification of the isolates. In the next part of the experimental work, the conditions for biomass growth and PHA production were optimized. Suitable carbon source, the ideal temperature for cultivation and the influence of precursors on the production of copolymers were studied and identified. The composition and proportion of PHA were determined spectrophotometrically and by GC-FID. Finally, visual screening of PHA accumulation inside bacterial cells was performed using fluorescence microscopy.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), bakteriální izoláty, termofilní mikroorganismy, aktivovaný kal, kompost, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Chelatococcus composti*, *Paenibacillus sp.* .

## KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates (PHA), bacterial isolates, thermophilic microorganisms, activated sludge, compost, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Chelatococcus composti*, *Paenibacillus sp.* .

MATĚJKA, Filip. *Biotechnologická produkce PHA pomocí vybraných bakteriálních isolátů* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-14]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123992>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD. za odborné vedení a čas, který mi věnoval. Rád bych také vyjádřil dík mé konzultantce Ing. Ivě Pernicové za pomoc nejen v laboratoři ale také při psaní celé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Xenii Kouřilové a všem přítomným v laboratoři, kteří přispěli ke vzniku této práce.

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
2.1	Polyhydroxyalkanoáty a jejich historie .....	8
2.1.1	Charakteristika a rozdělení PHA .....	8
2.1.2	Fyzikální a chemické vlastnosti .....	9
2.1.3	Využití a aplikace .....	9
2.2	Extremofilní mikroorganismy .....	9
2.2.1	Termofilní bakterie .....	10
2.2.2	<i>Thermus thermophilus</i> .....	12
2.2.3	<i>Thermotoga maritima</i> .....	13
2.2.4	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> .....	14
2.2.5	<i>Chelatococcus composti</i> .....	14
2.2.6	Acidofilní bakterie .....	14
2.2.7	Alkalofilní bakterie .....	14
2.2.8	Halofilní bakterie .....	15
2.2.9	Využití a trendy extremofilů .....	15
2.3	Biotechnologická produkce PHA pomocí termofilů .....	16
2.3.1	Strategie Next Generation Industrial Biotechnology .....	16
2.3.2	Biosyntéza PHA .....	17
2.3.3	PHA syntázy .....	18
2.4	Aktivovaný kal .....	18
2.5	Kompostování .....	19
2.6	Izolace PHA produkujících bakterií .....	20
2.7	Metody prostanovení kvality a množství PHA .....	22
2.7.1	Barvení a mikroskopie .....	22
2.7.2	Spektrofotometrické metody .....	22
2.7.3	Chromatografické metody .....	24
2.7.4	Ostatní metody .....	24
<b>3</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>25</b>
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje .....	25
3.1.1	Mikroorganismy .....	25
3.1.2	Chemikálie pro kultivaci .....	25
3.1.3	Chemikálie pro utilizaci uhlíkatých zdroj .....	25
3.1.4	Komponenty pro izolaci DNA, PCR a agarózovou elektroforézu .....	25

3.1.5	Komponenty pro fluorescenční spektroskopii .....	26
3.1.6	Přístroje .....	26
3.2	Kultivace mikroorganismů .....	26
3.2.1	Příprava inokulačního média .....	26
3.2.2	Příprava produkčního média .....	26
3.3	Příprava roztoků .....	27
3.3.1	Lyzační pufr .....	27
3.3.2	TBE pufr pro gelovou elektroforézu .....	27
3.3.3	Příprava fosfátového pufru (PBS) .....	28
3.3.4	Agarózový gel pro elektroforézu .....	28
3.4	Použité metody .....	28
3.4.1	Molekulárně biologické techniky .....	28
3.4.2	Optimalizace produkce PHA .....	30
3.4.3	Stanovení obsahu biomasy .....	31
3.4.4	Analýza množství a složení PHA v biomase .....	31
3.4.5	Screening PHA granulí pomocí fluorescenční spektroskopie .....	32
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse .....</b>	<b>33</b>
4.1	Identifikace <i>phaC</i> genu pomocí PCR .....	33
4.2	Identifikace izolátů pomocí DNA sekvenace .....	34
4.3	Optimalizace podmínek pro produkci .....	34
4.3.1	Schopnost utilizace vybraných substrátů .....	34
4.3.2	Výběr optimálního zdroje uhlíku .....	36
4.3.3	Stanovení optimální teploty .....	37
4.3.4	Stanovení vlivu prekurzorů .....	40
4.4	Screening PHA granulí pomocí fluorescenční spektroskopie .....	42
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Použité zdroje .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>54</b>

# 1 ÚVOD

Syntetické plasty nabízejí řadu komplexních vlastností jako je zejména jejich pevnost, nízká hmotnost, a především velmi dlouhá trvanlivost. Přestože nejsou biodegradabilní a velkou mírou zatěžují životní prostředí, jsou bohužel stále neodmyslitelnou součástí běžného života. Jedná se především o nahrazení skla, různých keramických a kovových materiálů či papíru, které vystřídal petrochemický plast.

Pokud jsou syntetické plasty zakomponovány do takzvaných dlouhotrvajících výrobků například v automobilovém průmyslu, pak představují daleko menší riziko než jednorázové plastové výrobky, které se objevují zejména v průmyslu potravinářském. Zde bychom mohli s jistotou zařadit obalové materiály vytlačující papír anebo přístroje, talíře, kelímky či brčka na jedno použití. Řešení by mohly přinést plasty vyrobené pomocí mikroorganismů, které mají velmi podobné mechanické a technologické vlastnosti, ale jejich samovolný rozpad v přírodě je pouze otázkou několika měsíců, nikoliv let.

Bezesporu hlavní nevýhodou produkce přírodních plastů jsou vysoké náklady a časová náročnost. Tyto nedostatky bychom však měli být schopni eliminovat vhodnou kombinací výrobních metod, technologií a postupů. Není nutné hledat složitá řešení, a protože mluvíme o plastech, stačí se zaměřit na mikroorganismy, které se vyskytují v přírodě kolem nás a jsou schopny takovéto plasty vyprodukovat. Zásadní je nalezení vhodného producenta a v našem případě se jedná o bakterie, jež jsou schopny produkovat přírodní plasty z různých uhlíkatých zdrojů a za určitých podmínek.

Některé bakterie jsou schopny vyprodukovat přírodní polymery PHA – polyhydroxyalkanoáty, jako zásobní zdroj uhlíku a energie. Bakteriální výroba plastů je založena na kultivaci vhodného zástupce, kterému je nutné zvolit také vhodné podmínky jako je teplota, prostředí, pH a především živiny, ze kterých bude tvorba polymeru probíhat. Díky těmto aspektům existuje široká škála možných kombinací pro tvorbu ideálního produktu a je možné vyřešit více problémů naráz. Pokud vybereme vhodnou bakterii, která je schopna přeměnit například odpadní oleje z velkovýrobních továren na formu PHA, nejenže získáme přírodní materiál, ale snížíme takto i finanční náklady. Při správné kombinaci těchto faktorů je možné dosáhnout zajímavých výsledků a posunout tak proces výroby naturálních plastů dopředu.

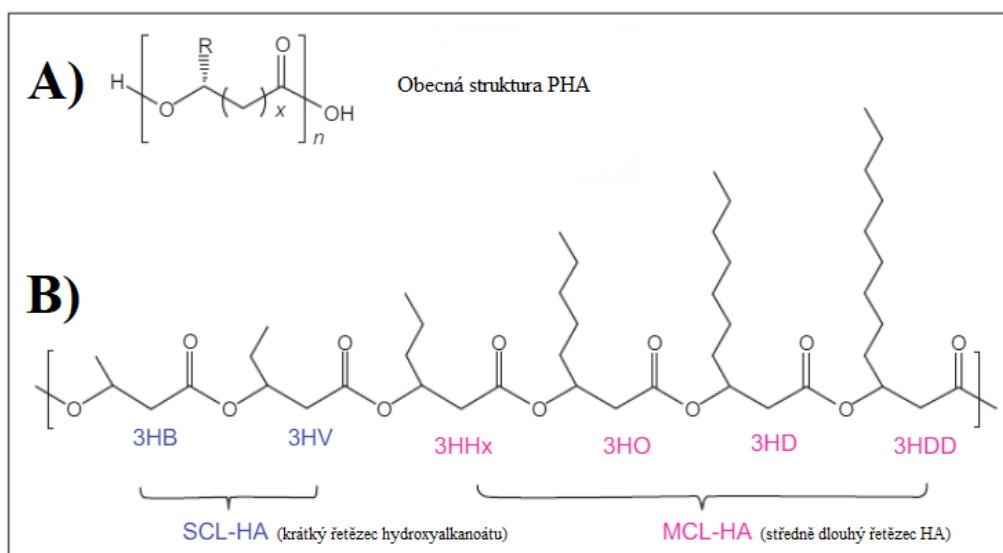
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Polyhydroxyalkanoáty a jejich historie

Jedna z prvních zmínek o PHA se datuje k roku 1888, kdy nizozemský botanik a mikrobiolog Martinus Willem Beijerinck biopolymery pozoroval, ale bohužel v této době ještě nemohl určit jejich přesné složení. Poté až v roce 1926 se francouzskému badateli a agronomovi Lemoigneovi úspěšně podařilo izolovat poly-3-hydroxybutyrát neboli P(3HB) řadící se mezi polyhydroxyalkanoáty z bakterie *Bacillus megaterium*. V roce 1958 bylo zjištěno, že PHA je v bakteriálních buňkách zásobním zdrojem uhlíku a energie. Od roku 1980 se pak objevují první technologické postupy pro výrobu PHA pomocí bakteriálních izolátů a dochází k zakládání obchodní značek. Na přelomu století dochází k útlumu a výroba bio plastů je díky vysokým nákladům odsouvána. Posledních pár let je trh s polyhydroxyalkanoáty velmi malý a jejich produkce je hlavně předmětem výzkumných center, avšak z důvodu narůstající ekologické stopy na Zemi a volání po biodegradabilních materiálech má PHA obrovský potenciál. Mohlo by se jednat o přírodní materiál budoucnosti [1].

#### 2.1.1 Charakteristika a rozdělení PHA

Polyhydroxyalkanoáty jsou lineární polymery složené z monomerních podjednotek. Monomery jsou tvořeny hydroxy kyselinami spojenými esterovou vazbou. Celý polymer pak vzniká pomocí vazby mezi karboxylovou skupinou monomeru a sousední hydroxylovou skupinou dalšího monomeru. Dále je zde ještě obsažena postranní funkční skupina, která má vliv na charakter polymeru. Podle počtu uhlíků v monomeru můžeme polyhydroxyalkanoáty rozdělit na dvě hlavní skupiny. Scl-PHA (short chain lenght) neboli krátké řetězce PHA sestávají se ze 3-5 uhlíků, naopak mcl-PHA (medium chain lenght), středně dlouhé řetězce PHA, obsahují 6-14 uhlíků. Grafické znázornění struktur je na obrázku 1 [2].



**Obrázek 1:** Grafické schéma klasifikace polyhydroxyalkanoátů. 3HB: 3-hydroxybutyrát, 3HV: 3-hydroxyvalerát, 3HHx: 3-hydroxyhexanoát, 3HO: 3-hydroxyoktanoát, 3HD: 3-hydroxydekanoát, 3HDD: 3-hydroxydodekanoát [3].



Dále je také možné se setkat lcl-PHA (long chain lenght) neboli dlouhým řetězcem PHA. Tento monomer obsahuje víc než 14 uhlíků a zatím nebyl dostatečně prozkoumán. Pokud je PHA tvořeno pouze jedním typem monomeru, hovoříme o homopolymeru objevují různé monomery, pak se jedná o heteropolyestery [4].

### **2.1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti**

Polyhydroxyalkanoáty se svými vlastnostmi velmi podobají syntetickým plastům. Obecně se jedná o polymery nerozpustné ve vodě a v závislosti na počtu uhlíků v řetězci monomeru se mění jejich fyzikální a chemické vlastnosti. U scl-PHA převládá termoplastický charakter, kdy teplota tání se pohybuje v rozmezí 100-170 °C. Naopak mcl-PHA má elastomerické vlastnosti a teplota tání nestává mezi 40-80 °C. Jejich biodegradabilita a biokompatibilita je téměř stoprocentní. PHA jsou netoxické, což umožňuje jejich širokospektrální využití jak ve farmaceutickém, tak v potravinářském průmyslu. Krystalinita se u většiny polyhydroxyalkanoátů pohybuje v rozmezí 60-80 %. Dále jsou UV stabilní, vykazují určitý piezoelektrický charakter a nepropouští plynné látky [1, 5].

### **2.1.3 Využití a aplikace**

Využití polyhydroxyalkanoátů má do budoucna veliký potenciál hlavně díky možnosti jejich začlenění do dalších funkčních látek. Primárně se jedná o nahrazení klasických jednorázových petrochemických plastů a obalových materiálů, které se vyskytují převážně v potravinářském či kosmetickém průmyslu. V poslední době se PHA dostává také na pole biomedicíny. Jedná se o různé kardiovaskulární implantáty (např. srdeční chlopně), transport léků (mikro nosiče), ortopedii (kostní náhrady) či stomatologii. Kvůli vysoké molekulové hmotnosti může být PHA také užitečné pro výrobu ultra pevných vláken například pro rybolov [1, 3].

## **2.2 Extremofilní mikroorganismy**

Extremofilní mikroorganismy se vymykají normálu, jelikož se vyskytují a prosperují v podmínkách pro běžný život zcela nevhodných. Jsou tedy schopny života za extrémních podmínek, které se značně liší od optimálních podmínek pro život běžných organismů. Normální podmínky pro život lze definovat při teplotě 20–25 °C, neutrálním pH, zhruba 20% obsahu kyslíku v atmosféře a standartním atmosférickém tlaku. Extremofilní mikroorganismy z těchto parametrů různě vybočují a často se tak nacházejí na dně oceánů, v arktických oblastech, hypertermálních pramenech, absolutní tmě nebo také na místech s přirozenou radiací. Fungují za vysokých či nízkých hodnot teploty a tlaku. Nevadí jim různá prostředí jako je pH, salinita, koncentrace těžkých kovů anebo radiace. Tyto extrémní podmínky extremofilům nevadí, naopak jsou schopni z nich profitovat [6]. Rozdělení extremofilních mikroorganismů je obsaženo v tabulce 1.

Mikroorganismy, které jsou vázány jedním extrémem, jsou obvykle označovány jako extrémofily, avšak mnoho prostředí na naší planetě v sobě zahrnuje dvě a více extrémních podmínek. Typicky se jedná například o geotermální prameny, kde se může vyskytovat 4kyselé či zásadité prostředí a také se zde nachází vysoký obsah kovů. U kmenů izolovaných z těchto prostředí bylo zjištěno, že jsou schopny tyto kombinace extrémů akceptovat, a tudíž jsou označovány jako polyextremofilní [7].

**Tabulka 1:** Rozdělení extrémofilních mikroorganismů na základě enviromentálního parametru [6].

Enviromentální parametr	Skupina	Definice jejich podmínek	Příklad mikroorganismu
Teplota	Psychofilní	Růst <15 °C	<i>Psychrobacter</i>
	Mezofilní	Růst 15–45 °C	<i>Escherichia coli</i>
	Termofilní	Růst 45–80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	Hypertermofilní	Růst > 80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i>
Tlak	Piezofilní (Barofilní)	Vyžadují vyšší tlak, než je atmosférický a také vysoký hydrostatický	<i>Shewanella</i> , <i>Moritella</i>
Salinita	Halofilní	Koncentrace solí (2-5 M NaCl)	<i>Dunaliella salina</i>
pH	Alkalofilní	pH > 9	<i>Bacillus firmus</i>
	Acidofilní	pH < 4	<i>Cyanidium caldarium</i>
Kyslíkový požadavek	Aerobní	Potřebují kyslík	<i>Acetobacter</i>
	Anaerobní	Nepotřebují kyslík	<i>Methanococcus jannaschii</i>
	Mikroaerofilní	Nižší koncentrace kyslíku, než je v zemské atmosféře	<i>Clostridium</i>
Radiace	-	Tolerují radiaci	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Vakuum	-	Tolerují vakuum	<i>Tardigrada</i>

Extremofilní mikroorganismy pak lze rozdělit do dvou objemných skupin. První skupinu lze označit jako striktně extrémofilní organismy, které pro svůj růst vyžadují jednu nebo více extrémních podmínek. Druhá skupina jsou extremotolerantní organismy, které jsou schopny akceptovat extrémní hodnoty jednoho nebo více fyzikálně-chemických parametrů ale optimálně rostou za podmínek normálních [8].

## 2.2.1 Termofilní bakterie

Veškeré organismy naší planety zaujímají určitý vztah k teplotnímu prostředí. Za hraniční teplotu pro existenci se při standartní hodnotě tlaku považuje rozmezí 180–200 °C, poté dochází k poškození nukleotidů a genetické informace. Termofilní bakterie, které lze také označit jako bakterie teplomilné, ke svému fungování vyžadují vysoké teploty, a proto se přirozeně vyskytují v teplých oblastech. Často se tak s nimi můžeme v přírodě setkat u geotermálních pramenů, v sopečných oblastech, v kompostových haldách či v rašelinách. Díky tomu, že jsou tyto mikroorganismy vystavovány vysokým teplotám, u nich došlo k adaptaci jak po stránce morfologické, tak metabolické [9].

### 2.2.1.1 Charakteristika a rozdělení termofilních bakterií

U bakterií lze obecně jako základní charakteristiku použít jejich strukturu stěny, která se projevuje gram pozitivním a gram negativním barvením. Buněčná stěna bakterií sestává převážně z peptidoglykanu, který je tvořen z glykanové páteře muramové kyseliny a glukosaminu a peptidových řetězců, které se hustě síťují do můstků gram pozitivních, naopak u gram negativních je toto síťování řidší. Gram pozitivní bakterie mají v peptidoglykanu vmezeřenou zpravidla ještě kyselinu teichovou, kdežto u gram negativních se vyskytuje jen výjimečně a namísto kyseliny teichové obsahují lipopolysacharidy [10].

Hlavním charakteristickým rysem termofilních bakterií je však jejich adaptační mechanismus sloužící k přežívání za vysokých teplot. Při evolučním vývoji termofilních mikroorganismů došlo k přizpůsobení buněčné a molekulární úrovni pro život za vysokých teplot, k čemuž u mezofilních druhů nedošlo. Vzhledem k menší velikosti buněk se zdá, že jakákoliv izolace proti

teplotním vlivům není možná, avšak všechny komponenty buněk musí přeci jen být vůči teplu odolné. Membránové lipidy obsahují etherovou vazbu, jsou větvené, nasycené a mají vysokou molekulovou hmotnost. Na rozdíl od esterových lipidů, které jsou známé u mezofilních druhů, může být stabilita a teplotní odolnost membrán u termofilních bakterií větší. Proteinové struktury mají vysoce organizované hydrofobní interakce, více vodíkových a nekovalentních vazeb. Přizpůsobena je také odolnost deoxyribonukleové kyseliny pomocí reverzní gyrázy, což je enzym ze skupiny topoizomeráz, který je do struktury schopen přidat dodatečné vynutí a zvýšit tak její stabilitu. DNA termofilních bakterií je proti vysokým teplotám chráněna také pomocí solných můstků. Struktury nukleových kyselin jsou proti tepelné destrukci stabilizovány zvýšeným obsahem párů G-C v klíčových oblastech párování bází, jelikož páry G-C jsou drženy třemi vodíkovými můstky oproti slabším A-T párům, které jsou drženy můstky dvěma. S tímto také souvisí termostabilita enzymů, které obsahují zvýšené množství disulfidických můstků mezi cysteinovými zbytky a jsou důležité pro celkovou strukturu proteinu.

Pokud vezmeme v úvahu teploty kolem 100 °C, kde jsou schopni přežít například hypertermofilní organismy, tak na této hranici již dochází u některých sloučenin s nízkou molekulovou hmotností, jako je ATP či NAD k poměrně rychlé hydrolýze a také se zde rozkládají termolabilní aminokyseliny jako cystein a kyselina glutamová. Přežití organismů rostoucích při těchto teplotách může být zajištěno pomocí rychlé re-syntézy takovýchto sloučenin. Díky tomu je také při vyšších teplotách upravena propustnost protonových membrán pro udržení elektrochemického gradientu, který poskytuje zisk energie. Termofilní a hypertermofilní mikroorganismy patří do dvou fylogeneticky velmi odlišných skupin, *Bacteria* a *Archaea*. Proto strategie molekulárních mechanismů včetně adaptace na vysoké teploty mohou být poněkud odlišné v závislosti na fylogenetické povaze mikroorganismu [11-13].

Teplotní rozdělení je pouze obecné, jelikož každá bakterie má určitou vlastní teplotní hranici aktivity. U termofilních bakterií je optimální růstová teplota považována za zhruba 55 °C a extrémních termofilů se pohybuje v rozmezí 65-70°C. Pro hypertermofilní bakterie, pro které je vhodné teplotní prostředí nad 80 °C, kdy například bakterie *Thermotoga thermarum* je nejaktivnější při teplotě 95 °C. Obecně lze tedy říct, že optimální teplota pro růst většiny termofilních bakterií je pod hranicí 70 °C. V tabulce 2 jsou zahrnuty také *Archaea*, jejichž teplotní optima se kvůli různým rozsahům obtížně definují. Optimum se tak u většiny zástupců pohybuje v rozmezí 65-90 °C, avšak u rodů *Pyrococcus* a *Pyrolobus* může atakovat hranici 100 °C [14].

**Tabulka 2:** Taxonomické rozdělení vybraných termofilních bakterií [15].

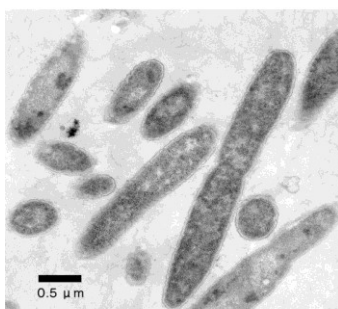
Řád	Rod	T-optimum [°C]	Anaerobní / aerobní
<b>Bacteria</b>			
Thermotogales	<i>Petrogona</i>	55-60	Anaerobní
	<i>Marinitoga</i>	55-65	Anaerobní
	<i>Thermosipho</i>	65-75	Anaerobní
	<i>Thermotoga</i>	65-85	Anaerobní
Aquificales	<i>Hydrogenothermus</i>	65	Anaerobní
	<i>Hydrogenobacter</i>	65-76	Anaerobní
	<i>Persephonella</i>	70-73	Anaerobní
	<i>Aquifex</i>	85	Aerobní

Thermoanaerobacterales	<i>Gelria</i>	55	Anaerobní
	<i>Coprothermobacter</i>	55-60	Anaerobní
	<i>Thermovenabulum</i>	60	Anaerobní
	<i>Thermanaeromonas</i>	70	Anaerobní
Sphingobacterales	<i>Rhodothermus</i>	65	Aerobní
Dictyoglomales	<i>Dictyoglomus</i>	70-75	Anaerobní
Thermales	<i>Thermus</i>	50-80	Aerobní
	<i>Marinithermus</i>	70	Aerobní
	<i>Vulcanitermus</i>	70	Aerobní
<b>Archaea</b>			
Sulfolobales	<i>Metallosphaera</i>	65-75	Aerobní
	<i>Sulfolobus</i>	65-85	Aerobní
Thermoproteales	<i>Thermoproteus</i>	85	Anaerobní
	<i>Pyrobaculum</i>	90-100	Fakultativně anaerobní
Desulfurococcales	<i>Desulfurococcus</i>	85-90	Anaerobní
	<i>Aeropyrum</i>	90-95	Aerobní
	<i>Pyrolobus</i>	103	Fakultativně anaerobní
Thermococcales	<i>Thermococcus</i>	75-90	Anaerobní
	<i>Pyrococcus</i>	95-100	Anaerobní
Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus</i>	75-85	Anaerobní
	<i>Ferroglobus</i>	85	Anaerobní

### 2.2.2 *Thermus thermophilus*

Rod *Thermus* byl izolován původně z vnitrozemských termálních pramenů s neutrálním nebo alkalickým prostředím a často se také nachází v průmyslových kompostech. Později se podařilo tento druh izolovat z mořských teplých pramenů v mělkých hloubkách ale i z prostředí hydrotermálních proudů v hloubce 2000 m Guyamaské pánve v Kalifornii. Samotný *Thermus thermophilus* na obrázku 2 byl poprvé izolován v Japonsku v roce 1971 a jedná se o heterotrofní aerobní bakterii, která má gram negativní charakter, nesporuluje a je tyčinkovitého tvaru. Optimální růstová teplota se pohybuje v rozmezí 50-80 °C. Právě přítomnost rodu *Thermus* v horkých kompostových odpadech svědčí o tom, že tyto bakterie mohou hrát významnou roli při degradaci organického odpadu. Jejich tepelně stabilní enzymy štěpící odpadní produkty a vykazující odolnost vůči organickým rozpouštědlům zaznamenali veliký komerční potenciál. Izolace a vývoj katalytických makromolekul s termostabilními vlastnostmi zlepšují průmyslové fermentační systémy, v genetickém inženýrství se pak využívají enzymy získané z toho druhu a nejvyužívanější jsou především druhy HB8 a HB27 [9, 16, 17].

Termofilní bakterie nejsou jedinečné pouze ve své schopnosti přežít za vysokých teplot, ale také mají značnou schopnost přirozeně přeměňovat cizí DNA. Většina přirozeně kompetentních bakterií netransformuje plazmidovou DNA účinně, avšak například *Thermus thermophilus* HB27 je v tomto procesu nesmírně zdatný. Tento přirozený transformační mechanismus používaný termofily není stále zcela podrobně prozkoumán, ale odhaduje se, že tento způsob laterálního přenosu genů je nezbytně nutný pro přežití a vývoj termofilních organismů při extrémních teplotách [18, 19].

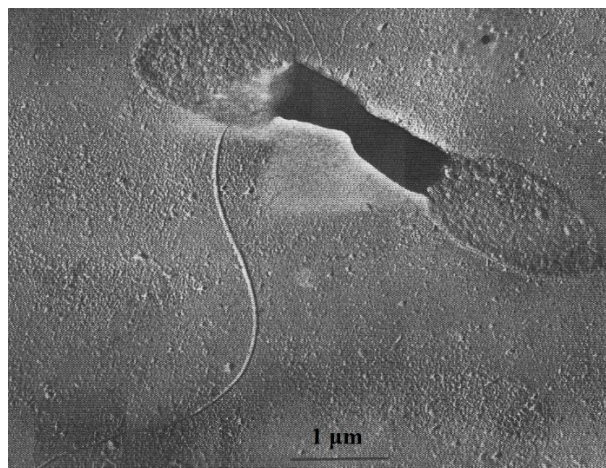


Obrázek 2: *Thermus thermophilus* [18].

### 2.2.3 *Thermotoga maritima*

Rod *Thermotoga* v sobě zahrnuje termofilní až hypertermofilní druhy bakterií, které byly původně studovány pro pochopení života za zvýšených teplot a pro biotechnologické účely. Druhy *Thermotoga* byly izolovány z geotermálně vyhřívaných prostředí po celém světě, včetně ropných vrtů, podmořských horkých pramenů a vulkánů. Jedná se anaerobní, tyčinkovité bakterie zapouzdřené do charakteristické vnější tógy – membrány. Pro svůj růst využívají uhlíkatých substrátů ve formě hexóz, pentóz, disacharidů, glukánů či chitinu, pektinu anebo amorfni celulózy. Primárními produkty fermentace jsou acetát, oxid uhličitý a vodík, ačkoliv byl také detekován laktát a ethanol. Některé druhy mohou používat například thiosulfát, síru a trojmocné železo jako akceptory elektronů [9, 19].

*Thermotoga maritima* na obrázku 3 je anaerobní, gram negativní, nesporulující eubakterie. Jedná se o hypertermofilní mikroorganismus, u kterého se považuje za optimální růstovou teplotu 80 °C a poprvé byl izolován z geotermální plochy mořského dna v Itálii. Zajímavý je především původ a evoluce této bakterie. Po dokončení genomové sekvenace *Thermotoga maritima* bylo zjištěno, že 24 % genů se nejvíce podobá oddělení Archaea, což naznačuje, že mezi těmito dvěma skupinami došlo v minulosti k významnému laterálnímu přenosu genů. Když však byl tento poznatek později opět prozkoumán a bylo k dispozici více údajů o genomové sekvenaci, bylo zjištěno, že pouze 7,7–11 % genů je podobným Archeam. Pokles zastoupení genů této podobnosti, je pravděpodobně spojen s nepřiměřenou expanzí počtu bakterií v porovnání s genomovými sekvencemi oddělení Archaea. Tyto studie genové diverzity tak odhalily, že geny zapojené do fundamentálních procesů a centrálního metabolismu jsou konzervativnější než ty, které jsou zodpovědné za použití specifických uhlíkatých substrátů a zejména polysacharidů. *T.maritima* je tak schopna metabolizovat mnoho typů sacharidů, například glukózu, sacharózu, celulózu, škrob a xylan. Jak xylan, tak celulóza jsou komplexní rostlinné polymery, a právě celulóza je nejhojněji vyskytujícím se biopolymerem v přírodě a obě tyto složky, mají velký potenciál jako obnovitelné zdroje uhlíku a energie [21, 22].



**SObrázek 3:** Dělicí se bičíkatá buňka bakterie *Thermotoga maritima* [22].

#### 2.2.4 *Aneurinibacillus thermoaerophilus*

Tento druh byl poprvé izolován z extraktu šťávy cukrové řepy v Rakousku a původně pojmenován jako *Bacillus thermoaerophilus*. Později byl však přeřazen do skupiny *Aneurinibacillus*. Jedná se o striktně aerobní gram pozitivní bakterii s tyčinkovitým tvarem. Obsahuje pohyblivý petritrichózní bičík a sporuluje. Délka buňky činí 3,7-5,4  $\mu\text{m}$  a šíře má rozměr 1-1,2  $\mu\text{m}$ . *Aneurinibacillus thermoaerophilus* je schopna růstu při teplotě 40-60  $^{\circ}\text{C}$ , kdy optimum se pohybuje mezi 55-60  $^{\circ}\text{C}$ . Vhodné pH pro její růst je 7-8. Již se podařilo z tohoto druhu izolovat termostabilní lipázu, která by mohla v budoucnu najít uplatnění [23, 24].

#### 2.2.5 *Chelatococcus composti*

Rod *Chelatococcus* spadá do skupiny *Alfaproteobacteria*. Druh *Chelatococcus composti* byl izolován v Číně ze zbylých plísní po fermentaci penicilinu s kompostem tvořeným z vepřového hnoje. Jedná se o gram negativní bakterii tyčinkovitého tvaru, která má na pólu umístěn jedno vláknový bičík. Šířka bakterie činí 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  a její délka dosahuje 1,8-2,8  $\mu\text{m}$ . Schopnost růstu nastává v rozmezí 20-60  $^{\circ}\text{C}$  a optimum je 35-40  $^{\circ}\text{C}$ . Optimální pH pro růst je 7,5-8, avšak nastává obecně při 5,5-10,0 pH. Kultivační doba je 48 h a následné kolonie mají kruhový tvar se žlutým zbarvením. Jejich povrch je hladký a lesklý [25].

#### 2.2.6 Acidofilní bakterie

Přežívají ve vysoce kyselém prostředí, kdy pH klesá od hodnoty 6 směrem k nule. Optimální hodnota pH pro růst extrémních acidofilů se pohybuje v rozmezí 2-3 a pro mírné acidofily v rozmezí 3-5. Některé z nich jsou schopny oxidovat síru a dvojmočné železo, čehož se využívá například u odstraňování kovů z odpadních vod. Mezi zástupce můžeme zařadit například rod *Sulfolobus* či *Mettalosphaera* [26].

#### 2.2.7 Alkalofilní bakterie

Optimální rychlost růstu nastává při vysokých hodnotách pH a je možné je rozdělit do dvou skupin. Alkalofilové obecně rostou při hodnotě pH vyšší než 9 a za optimum je považována hodnota pH 10. Naopak haloalkalofily potřebují k životu navíc ještě vysokou hodnotu salinity. Jejich schopnost udržet rozdílné pH vnitřního i vnějšího prostředí je dána stavbou buněčné stěny, která chrání vnitřní obsah buňky od vysoce zásaditého prostředí. Zástupci alkalofilních bakterií jsou *Bacillus* a *Streptomyces* [26, 27].

### 2.2.8 Halofilní bakterie

Halofilní mikroorganismy vyžadují pro svůj růst koncentraci soli vyšší než 2,5 mol/dm<sup>3</sup> NaCl. Za halotolerantní lze označit takové bakterie, které jsou schopny růstu za zvýšené koncentrace soli, avšak jejich optimální růst probíhá bez její přítomnosti. Dle požadavku na koncentraci NaCl v prostředí lze halofilní bakterie dále rozdělit na - mírně halofilní (1–5%), středně halofilní (5–25%) a extrémně halofilní (20–30%). Přežití halofilů v prostředí s vyšší koncentrací soli je dáno jejich vlastností udržení si osmotické rovnováhy a ta je dána reakcí na zvýšení koncentrace akumulací osmoticky aktivních látek v cytosolu. Díky nim se chrání před dehydratací a vysycháním cytoplazmy. Jako zástupce můžeme jmenovat rody *Sporosarcina* a *Salinicoccus* [26].

### 2.2.9 Využití a trendy extremofilů

Využití extremofilních mikroorganismů je velmi hojné především v oblasti biotechnologií a biomedicíny. Extremofilní organismy mají velice unikátní a zajímavé vlastnosti, které se dají využít v mnoha dalších odvětvích. Například enzymy extremofilů mají vysokou stabilitu a nižší riziko kontaminace detergenty oproti enzymům získaných z jiných organismů. Hojně využívaným enzymem je DNA-polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*, která se objevuje v řetězové polymerázové reakci. Principem je rychlé a účinné namnožení určitých sekvencí DNA, čehož se dá využít například při analýze potravin anebo kriminalistice. Používá se také celuláza izolovaná z extremofilních mikroorganismů. Ta se používá v různých biotechnologických oborech, a to především v textilním, papírenském a potravinářském průmyslu. Slouží k degradaci celulózy a nachází uplatnění také při přeměně lignocelulózy na glukózu, která se používá jako substrát pro výrobu bioetanolu. Při složitých technologických postupech komerčně dostupné celulázy nevykazují dostatečnou teplotní stabilitu, a tak se začínají uplatňovat celulázy izolované právě z extremofilních mikroorganismů. Obecně jsou pro biotechnologickou aplikaci vhodné halofilní mikroorganismy, a to především kvůli nízké náročnosti kultivace jednotlivých medií [14, 28].

Mezi další enzymy izolované z extremofilů lze zařadit například amylázy, lipázy či proteázy. Termofilní bakterie vyžadující při růstu vysoké teploty jsou velmi dobře teplotně stabilní, a proto se jejich enzymy využívají při výrobě detergentů, škrobářenském či mlékářenském průmyslu. Dále mají například halofilní bakterie svůj historický význam v potravinářském průmyslu, jako je například výroba soli z mořské vody anebo výroba potravin pomocí fermentace [14, 29].

V biomedicině by mohl nalézt uplatnění protein *Kavir-48* izolovaný z extremofilního rodu *Streptomyces*, který zvyšuje anti proliferaci aktivitu nádorových buněk. Apoptóza neboli buněčná smrt je nedílnou součástí diferenciačního cyklu buněk. Při karcinogenních onemocněních však velká část rakovinných buněk řízenou smrt vůbec nezahájí. Současně používaná cytostatika při léčbě rakoviny poškozují DNA, nebo inhibují samotnou replikaci DNA. Neproběhlá apoptóza pak přispívá k rezistenci rakovinných buněk a chemoterapeutická léčiva značně poškozují DNA. *Kavir-48* by mohl být součástí nových účinnějších cytostatik, která nebudou poškozovat DNA a budou aktivněji vyvolávat apoptózu nádorových buněk [30].



## 2.3 Biotechnologická produkce PHA pomocí termofilů

Jedním z cílů biotechnologického průmyslu je v současné době produkce polymerních materiálů

a biopaliv. Využívá se biotechnologického zpracování běžných zemědělských produktů, jako je například celulóza, škrob či mastné kyseliny. Tyto tradiční bioprocessy však vyžadují rozměrné bioreaktory vyrobené z nerezové oceli, komplikovanou a důkladnou sterilizaci, obtížné

a nákladné separační postupy, přítomnost procesních inženýrů a kontrolorů, kteří jsou schopni takového biologického zpracování vůbec provádět. Finanční náklady také navyšuje energetická náročnost, která je spojena se spotřebou vody a elektřiny, intenzivním provzdušňováním, nízkou přeměnou uhlíkatých substrátů na konečný produkt a celkovým pomalým růstem mikroorganismů. Důsledkem stávajících postupů je snížená konkurenční schopnost finálních bioproduktů. Řešením by mohlo být NGIB (z anglického "next generation industrial biotechnology") takzvaná průmyslová biotechnologie nové generace, která v kombinaci s použitím extrémofilních bakterií přináší řadu výhod a je schopna problémy současných biotechnologických procesů překonat [31-33].

### 2.3.1 Strategie Next Generation Industrial Biotechnology

Základem NGIB jsou mikroorganismy, které odolávají kontaminaci jinými kulturami. Vhodným kandidátem jsou extrémofilní mikroorganismy, které jsou schopny rychlého růstu při vysokých či nízkých teplotách nebo při extrémních hodnotách pH a osmotického tlaku. Halofilní bakterie jsou například schopny rychlého růstu v médiu s vysokými koncentracemi soli při vysokém pH a takto odolávají vůči kontaminaci, protože v těchto podmínkách je schopno přežít pouze minimum jiných mikroorganismů. Extrémofilové kultivování v extrémních podmínkách jsou tak jednoznačně odolnější vůči mikrobiální kontaminaci. Díky tomu je možné používat otevřené bioreaktory, u kterých odpadá nutnost sterilizace a na jejich výrobu lze použít cement, keramiku či plast a snížit tak náklady. Zbavení se sterilizačního kroku přispívá k nižší energetické náročnosti, spotřebě vody a celkových finančních nákladů na vybavení. Dále dochází k eliminaci nevýhod v podobě pomalého růstu mikroorganismů, nízké přeměny substrátu na produkt anebo časové náročnosti výroby jednoho produktu z konkrétní kultury. Pokud použijeme termofilní odpadají nároky na složité chladicí systémy pro reaktory a z toho vyplývá, že také personální zajištění v podobě technologů či bioinženýrů nevyžaduje tolik zaměstnanců. Pokud chceme NGIB maximálně využít, je nutné vybrat silnou kulturu s rychlým růstem, které bude odolná vůči kontaminaci a zároveň bude profitovat z podmínek uvedených dále. Jedná se o extrémní prostředí v rozmezí teplot, hodnot pH nebo osmotického tlaku. Dále to mohou být nestandardní substráty ať už v podobě metanolu, mastných kyselin s dlouhým řetězcem, alkoholů s krátkým řetězcem či plyných substrátů. Můžeme zde zařadit také nízké nároky na vodu, které vedou k dalšímu snížení celkových nákladů na produkci. Kultura, která splňuje nebo dokonce kombinuje tyto podmínky, se poté stává ideální pro NGIB. V tomto případě mají bezesporu navrch alkalofilní, halofilní a termofilní bakterie. Termofilní bakterie dobře odolávají mimo teplot také extrémním podmínkám v podobě denaturačních činidel nebo širokému rozsahu pH. Jak už bylo zmíněno dříve, při produkci termofilních mikroorganismů metodou NIGB není potřeba složitých chladicích systémů pro fermentační nádoby. Dále vyšší teplota má kladný vliv na jejich metabolickou aktivitu, a proto odpadá nutnost častého provzdušňování a díky tomu je možné používat menší bioreaktory. Výhodné jsou také izolované biokatalyzátory a polymerázy, které nabízejí skvělé vlastnosti. Všechny tyto



aspekty jsou schopny snižovat čas, náklady, umožňují vytvářet konkurence schopné produkty a dynamicky reagovat na změny trhu [33, 34].

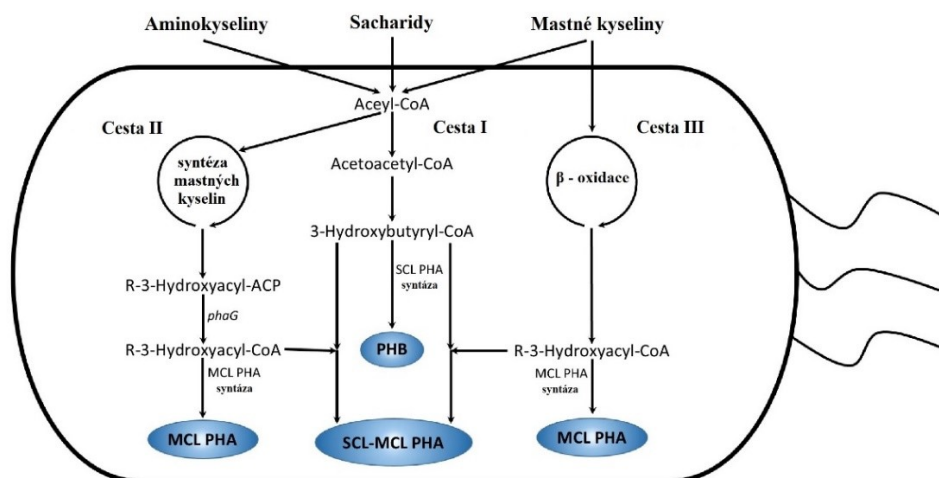
### 2.3.2 Biosyntéza PHA

Mechanismus syntézy PHA a jeho finální podoba je ve značné míře závislá na formě zdroje uhlíku. Uhlíkové zdroje se dělí na PHA strukturně příbuzné a nesouvisející zdroje uhlíku. Například mastné kyseliny jsou svou strukturou velmi podobné polyhydroxyalkanoátům a jsou tudíž označovány jako příbuzné substráty, zatímco glukóza nemá strukturu podobnou PHA a je takzvaným nesouvisejícím substrátem. Uhlíkatým zdrojem při biosyntéze jsou v současné době převážně tyto tři skupiny v podobě sacharidů, mastných kyselin a aminokyselin. Obecně lze tedy říct, že existují tři hlavní biosyntetické cesty na obrázku 4, kterými lze PHA získat [31, 35].

Cesta I popisuje syntézu scl-PHA, kdy dvě molekuly acetyl-CoA vytvořené ze zdroje sacharidu, mastných kyselin nebo aminokyselin jsou postupně konvertovány  $\beta$ -ketothiolázou a acetoacetyl-CoA reduktázou na hydroxybutyryl-CoA. Ten je nakonec polymerizován pomocí scl-PHA syntázy za vzniku polyhydroxybutyrátu, který je nejběžnějším produktem biosyntézy PHA. Tato biochemická cesta je typická například pro bakterii *Cupriavidus necator* [31].

Cesta II je cyklem syntézy mastných kyselin, který pro syntézu PHA poskytuje R-3-hydroxyacyl-ACP. Klíčovým enzymem je 3-hydroxyacyl, který je zároveň nosičem proteinu CoA-transferázy PhaG a ta transformuje 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA. Následně dochází k polymerizaci a vzniku mcl-PHA. Syntéza mastných kyselin in situ a  $\beta$ -oxidace mohou být na sobě nezávisle aktivní a dodávat prekurzory pro syntézu PHA naráz a na konci generovat jak krátké, tak dlouhé řetězce PHA [31].

Cesta III využívá pro syntézu mcl-PHA jako zdroj uhlíku mastné kyseliny a následně pracuje s meziprodukty  $\beta$ -oxidačního cyklu. Mastné kyseliny jsou nejprve přeměněny  $\beta$ -oxidací na enoyl-CoA. Ten je následně transformován R-3-hydroxyacyl-CoA hydratázou na R-3-hydroxyacyl-CoA, který je prekurzorem pro polymerizaci mcl-PHA. Samotná polymerizace je ve finále katalyzovaná mcl-PHA syntázou. *Pseudomonas putida* je zástupcem pro tuto biosyntetickou dráhu [31].



Obrázek 4: Hlavní biosyntetické dráhy pro tvorbu PHA [31].

### 2.3.3 PHA syntázy

PHA syntáza (PhaC) je klíčovým enzymem, který se podílí na tvorbě PHA, a to takovým způsobem, že zapříčiňuje polymeraci hydroxyacyl-CoA na konečný produkt PHA. Tyto syntázy byly rozděleny do čtyř hlavních tříd v tabulce 3 na základě jejich primární struktury, substrátové specifity a složení podjednotek. Nejznámější PHA syntázy jsou scl PHA syntázy, anebo mcl PHA syntázy. Existují také syntázy, které jsou schopny polymerovat oba typy monomerů, jak na scl, tak mcl, díky velmi nízké substrátové specifitě. Obecně se jedná o velmi malé množství syntáz, které jsou schopny takové to polymerizace, a proto se vyskytují jen zřídka [31,36].

Syntázy PHA třídy I a II sestávají pouze z jednoho typu podjednotek a to PhaC. Její molekulární hmotnost se pohybuje mezi 61-73 kDa. Třída I přednostně využívá jako substráty CoA-thioestery různých (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin, které sestávají z 3-5 atomů uhlíku. Oproti tomu třída II využívá CoA-thioestery (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin s delším řetězcem obsahujícím 6-14 atomů uhlíku. Molekulová velikost výsledného PHA se pro třídu I pohybuje v rozmezí 500-5000 kDa a u třídy II mezi 50-500 kDa. Syntázy PHA třídy III obsahují enzymy sestávající ze dvou různých typů podjednotek o podobné molekulové hmotnosti 40 kDa. PhaC vykazuje podobnost aminokyselinových sekvencí v rozmezí 21–28 % s třídou I a II, naopak druhá PhaE podjednotka tuto podobnost nevykazuje. Třída III preferuje substráty v podobě CoA-thioesterů (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin obsahujících 3-5 atomů uhlíku. Výsledná molekulová velikost PHA leží v tomto případě v oblasti tříd I a II. Syntázy PHA třídy IV jsou podobné třídě III, avšak PhaE podjednotka je nahrazena PhaR o molekulové hmotnosti zhruba 20 kDa [31, 37, 38].

**Tabulka 3:** Rozdělení PHA syntáz pro různé třídy (3/4/5 HA = 3-, 4- nebo 5-hydroxyalkanoát, #C = počet uhlíků v řetězci monomeru) [37, 38].

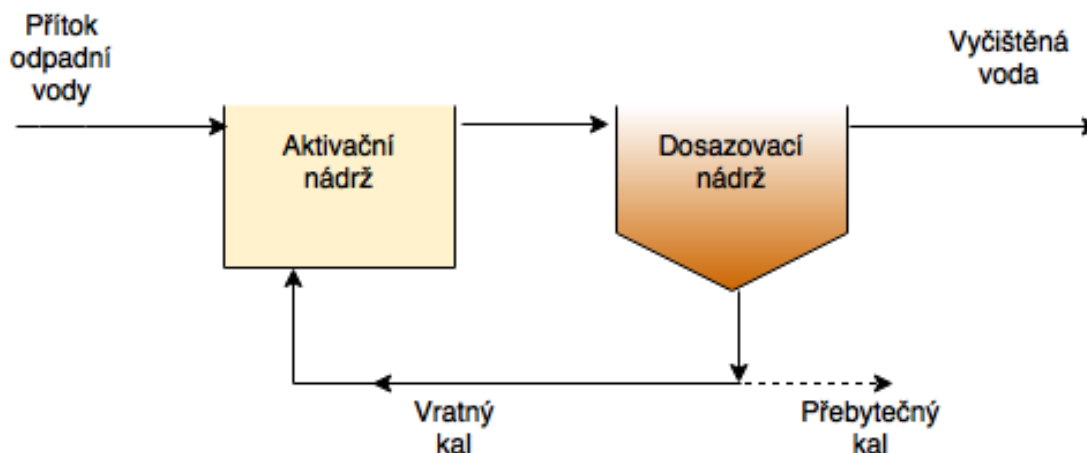
Třída	Podjednotka	Mr velikost	Typický zástupce	Substrát
I	PhaC	61-73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	3/4/5 HA, 3-5 C
II	PhaC	60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4/5 HA + 3 HA, 6-14 C + 3HB
III	PhaC, PhaE	40 kDa, 40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3/4/5 HA + 3 HA, 6-8 C
IV	PhaC, PhaR	40 kDa, 22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3 HA, 3-5 C

## 2.4 Aktivovaný kal

Čištění odpadních vod sloužilo primárně pro odstraňování nečistot, k obnově kvality vody a tím i k ochraně lidské či přírodní populace. V dnešních dnech dochází však díky nedostatku zdrojů k výrazným změnám v otázce zpracování odpadních vod. Aktuálně se na ně začíná pohlížet jako na obnovitelný zdroj, ze kterého lze kromě vody získat také další složky. Čističky vod se proto začínají stávat klíčovou součástí technologického procesu pro zpracování odpadních látek a jejich následné využití v průmyslu, kde nacházejí uplatnění také PHA produkující bakterie [39, 40].

Kal se v čističce na obrázku 5 usazuje ve formě primárního kalu, který se odděluje ze surové odpadní vody pomocí sedimentace v usazovacích nádržích. Jeho struktura je ve většině případů vločkovitá a je tvořena nerozpuštěnými látkami a mikroorganismy. Vločky aktivovaného kalu sedají na dno nádrže, a naopak čistá voda odtéká z vrchní části pryč. Aktivovaný kal je ze dna

dosazováku odváděn zpět do nádrže a tím je zajištěno, že se dosazovací nádrž nepřeplní a kal neutече do odtoku spolu s přečištěnou vodou [39, 40].



Obrázek 5: Schéma čističky odpadů vod [41].

Kaly obsahují zhruba 95 % vody, jejich zbarvení bývá hnědozelené. Obsah sušiny se v průměru pohybuje mezi 0,5 až 7 %, která obsahuje 20–35 % anorganický látek. Dále zde nalezneme okolo 70 % organických látek zejména ve formě bílkovin, lipidů a sacharidů. Většina částic tvořících kal má charakter koloidní nebo se jejich velikost blíží velikosti koloidů. Vyskytují se zde například zástupci rodů *Bacillus*, *Micrococcus* či *Mycobacterium* a mnohdy zde nalezneme také nitrifikační bakterie rodu *Nitrosomonas* [39, 40].

## 2.5 Kompostování

Průmyslové polymery jsou dnes vyráběny převážně z neobnovitelných zdrojů a na konci jejich životního cyklu jsou ukládány na skládky nebo umístěny do spaloven odpadů. S ohledem na snahu snižování emisí skleníkových plynů a nakládání s odpadními materiály, jejichž hromadění nabírá maximální kapacitu, začínají biodegradabilní materiály dostávat čím dál větší pozornost. PHA plasty mají obrovský potenciál do budoucna v nahrazení plastů ropných. Následné zacházení s takovým to bioodpadem formou kompostování nebo digescí eliminuje nutnost separace odpadu od přírody a zabraňuje produkci emisí při použití spaloven. Komposty přinášejí i další užitek v podobě hojné mikrobiální fauny, ze které je možné izolovat nové druhy, a především termofilní mikroorganismy (*Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*). Termofilní izoláty jsou pak také schopny produkce PHA [42, 43, 45].

Kompostování je komplexní, mikrobiální aerobní proces používaný k recyklaci organických materiálů, jejichž zdrojem jsou především průmyslové a zemědělské odpady. Organický materiál je zdrojem uhlíku, který následně slouží jako energie mikroorganismů – dále je přeměňován na oxid uhličitý. Důležitou roli hraje také přítomnost dusíku a celkový poměr C:N, kdy za optimum se považuje poměr 30:1 hmotností. Při jiných poměrech může docházet k neefektivnímu kompostování či k emisi dusíku do ovzduší a dochází tak k nepříjemným zápachům – typicky při recyklaci živočišných odpadů na hnojiva. Pro zabránění tohoto jevu slouží nitrifikační bakterie (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira*), které oxidují amoniak a snižují tak zápach. Kompostování je také často využíváno pro znovuoobnovu kontaminovaných půd. Jedná se především o termofilní proces, kdy se teploty v kompostových haldách mohou vyšplhat až na 80 °C [44, 45].

Celý proces obsahuje čtyři fáze a to – mezofilní, termofilní, chladící a zrající. V mezofilní fázi jsou rychle metabolizovány snadno labilní uhlíkaté substráty při teplotě 15-40 °C a díky této aerobní metabolické aktivitě je generováno teplo. Teplota je regulována provzdušňováním tak, aby mohla v další fázi narůstat. Při vzrůstu teploty nad 40 °C se mezofilní mikroorganismy stávají méně konkurenceschopnými a jsou nahrazeny aktivitou termofilních, především rod *Bacillus*, *Thermus*. Při teplotách 55 °C a výše dochází ke zničení patogenů a opět dochází k provzdušňování, kdy je možné při překročení hranice 80 °C většinu termofilních bakterií usmrtit a celý proces tak znehodnotit. Jakmile je většina substrátu rozložena a dochází k poklesu jeho koncentrace, nastává snižování teploty a proces chlazení. Konečná fáze dozrávání probíhá při teplotě pod 25 °C. Během této fáze pokračuje degradace odolnějších organických sloučenin a za účasti mezofilní a makro fauny. Doba trvání každé fáze pak závisí na počátečním složení materiálu, obsahu vody, provzdušňování, pH, teplotě, koncentraci kyslíku a složení mikrobiální populace [44, 45].

## 2.6 Izolace PHA produkujících bakterií

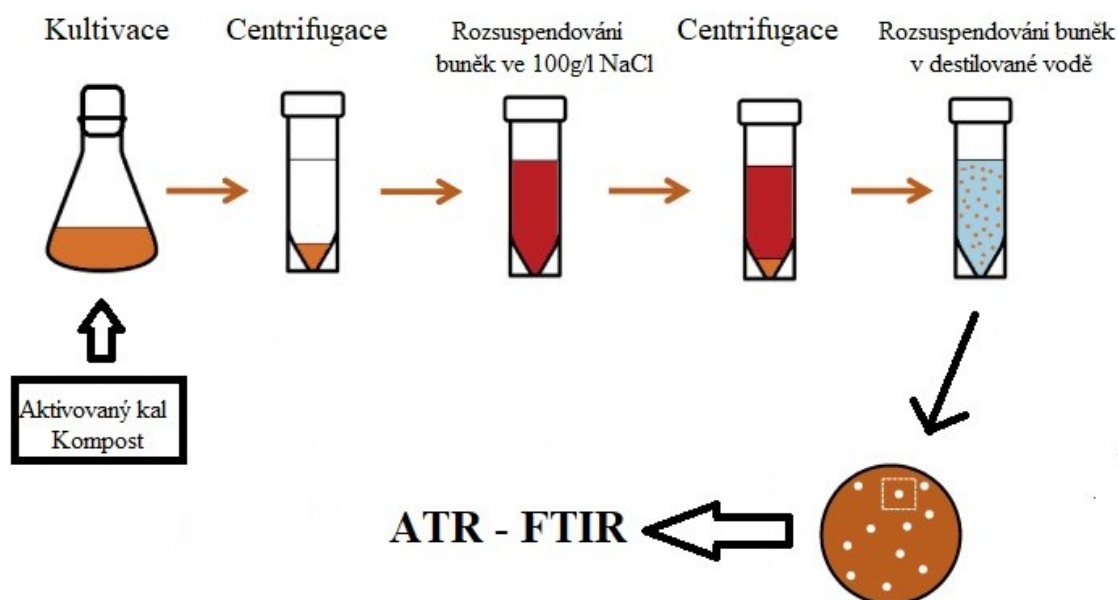
Za poslední dobu bylo z různých typů prostředí izolováno široké spektrum mikroorganismů, které jsou schopny produkce PHA. Může za to především velké úsilí při navrhování nových kultivačních metod pro dosud neizolované druhy, které v tomto směru za poslední dvě dekády razantně pokročili, což právě umožnilo izolace nových druhů [46].

Většina dosud používaných kultivačních médií je bohatá na živiny. Ukázalo se však, že tyto podmínky mohou podporovat rychle rostoucí bakterie na úkor pomalu rostoucích druhů, z nichž některým se daří v prostředí, které je na živiny chudé, a tím pádem jsou takovými médii inhibovány. V důsledku toho se začala používat zředěná živná média, která vedou k úspěšné kultivaci, dosud neizolovaných mikroorganismů. Dále například bakterie nacházející se zejména ve vodním – oligotrofním prostředí, rostou velmi pomalu. Prodloužení inkubační doby je předpokladem pro kultivaci takových bakterií a s tím je spjatá další výhoda v podobě odumírání rychle rostoucích druhů, což ve smíšených populacích vede ke snížení konkurence a prostor tak dostávají obtížně kultivovatelné mikroorganismy. U řady druhů však nelze jejich přírodní podmínky laboratorně plně nahradit, a tak byla vyvinuta technika, která tyto podmínky napodobuje. Jedná se o difúzní komory, které umožňují průchod látek z přírodního prostředí přes membránu a bakterie jsou tak schopny růstu. Následně je možné je kultivovat na pevném médiu a izolovat. Tato technika má dle studií významně větší rozmanitost získaných izolátů než při použití běžných konvenčních agarových ploten [46].

Nejčastěji se z přírody napřímo izolují konkrétní druhy, které se v daném prostředí nacházejí anebo je možné je izolovat z mikrobiálního konsorcia. Pro snížení fyzického počtu a rozmanitosti bakterií v konsorciích je používána řada metod. Mezi ně patří především různé filtrační techniky, centrifugace v hustotním gradientu anebo elutriace. Právě mikrobiální konsorcia jsou součástí především aktivovaných kalů či kompostových půd. Výhodou takovýchto izolátů je schopnost utilizace odpadních substrátů, rezistivita vůči kontaminaci a dobrá adaptace. Díky tomu lze například nadbytečné odpadní materiály přeměňovat na biopolymery za využití levnějšího zdroje uhlíku. Samotnou izolaci lze obecně popsat následujícím způsobem. Odebraná kultura je převedena do formy inokula, kde dochází k jejímu nárůstu. Dále je přemístěna do produkčního média, které obsahuje zdroj uhlíku – nejčastěji ve formě univerzálního glycerolu a dochází k potenciální syntéze PHA. Kultura z produkce je poté přenesena na Petriho misku s agarem a obarvena Nilskou červení. PHA pozitivní izolát následně vykazuje pod UV lampu fluorescentní kolonie. Použití nilské červeně lze tedy použít

k odlišení kolonií produkujících PHA od jejich negativních protějšků. Tento postup je hojně využíván pro izolaci producentů PHA, avšak jej nelze označit za plně univerzální, a to především pro komplikace při izolaci termofilních kmenů ze smíšených kultur [46, 47, 49].

Použití této metody izolace termofilních kmenů ze zdrojů v podobě aktivovaného kalu či kompostu může vést k zavádějícím výsledkům. Pozitivní barvení Nilskou červení u bakterií morfologicky přizpůsobeným vyšším teplotám nemusí být primárně spojeno s přítomností PHA a může vykazovat chybné pozitivní výsledky. Tento jev může být způsoben například přítomností speciálních lipidů u termofilních bakterií, se kterými může barvivo interagovat a způsobovat pozitivní barvení. Vhodnější metodou je takzvaná osmo – selektivní strategie na obrázku 6, která využívá osmotického stresu, kdy je smíšená kultura vystavena hypertonickým a poté hypotonickým podmínkám. Tato metoda se opírá o skutečnost, že přítomnost granulí PHA v buňkách bakterií je jakousi ochrannou složkou před náhlými výkyvy osmotického tlaku. Po náhlém přechodu buněk z hypertonického prostředí do prostředí hypotonického dochází u buněk, které mají vysoký obsah PHA, k zachování integrity jejich cytoplazmatické membrány díky působení příslušných pump a mechanosenzitivních kanálů. Naopak buňky s nízkým nebo žádným obsahem PHA nejsou schopny na takovou změnu reagovat a jejich integrita je narušena. Kvůli tomu dochází k poškození jejich cytoplazmatických membrán a následné lyzi. Využitím tohoto jevu lze tedy vyselektovat kolonie z mikrobiálního konsorcia a následně je dále analyzovat. Jelikož však Nilská červeně či jiná barviva na této bázi (Nilská Modř A, Sudan Black B) neposkytují přesné výsledky u termofilních bakterií, lze zvolit alternativní metodu pro určení přítomnosti PHA u termofilních bakterií, a to pomocí FTIR – infračervené spektroskopie. ATR-FTIR slouží k rychlé a přesné identifikaci pozitivních PHA kolonií, kdy lze následně izolovat vybrané PHA produkující termofilní kmeny z mikrobiálního konsorcia [49, 50].



**Obrázek 6:** Metoda osmo-selektivní strategie pro izolaci PHA produkujících termofilních bakterií [50].

## 2.7 Metody prostanovení kvality a množství PHA

Polyhydroxyalkanoáty se hromadí uvnitř buněk mikroorganismů ve formě granulí v době kdy je jejich růst omezen limitní složkou přítomnosti zdroje uhlíku a musí se tak vyrovnávat s extrémními podmínkami. Následná analýza, charakterizace a identifikace PHA produktů vyžaduje rychlou a spolehlivou metodou. K dispozici je řada metod pro screening produkcí bakterií a jejich použití se liší pro konkrétní projekty. Níže následuje přehled nejběžněji využívaných metod [51].

### 2.7.1 Barvení a mikroskopie

Jedním z prvních a dodnes hojně používaným postupem je detekce pomocí barvení Sudanem Black B (I, II, III). Využívá se při prvotním podezření na přítomnost PHB granulí v bakteriálních buňkách [51, 52].

Při tepelné fixaci buněk kultury na podložním sklíčku se pro obarvení využívá Nilská Modř A. Preparát je následně zkoumán pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy se používá excitační vlnová délka 460 nm a granule vykazují oranžovou fluorescenci. Ostatní inkluzní tělíska ve složení buněk jako je například glykogen se Nilskou modří A nezbarvují, což dodává na detekční přesnosti. Alternativou může být standartní obarvení kultury na Petriho misce, osvit pod UV lampou a přítomnost PHB signalizuje fluorescence [51, 52].

Z barvicích metod je Nilská červeň v současnosti nejhojněji využívaná metoda pro screening. Barvení opět poskytuje pod UV zářením fluorescentní kolonie s přítomností polyhydroxyalkanoátů. Jak již bylo diskutováno výše, metoda nemusí být úplně vhodná pro termofilní bakterie [51, 52].

Fluorescenční mikroskopie používá také další barviva pro detekci granulí jako je například akridinová oranž či BodiPy. Technika FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace při screeningu granulí má zde také své uplatnění [51, 52].

### 2.7.2 Spektrofotometrické metody

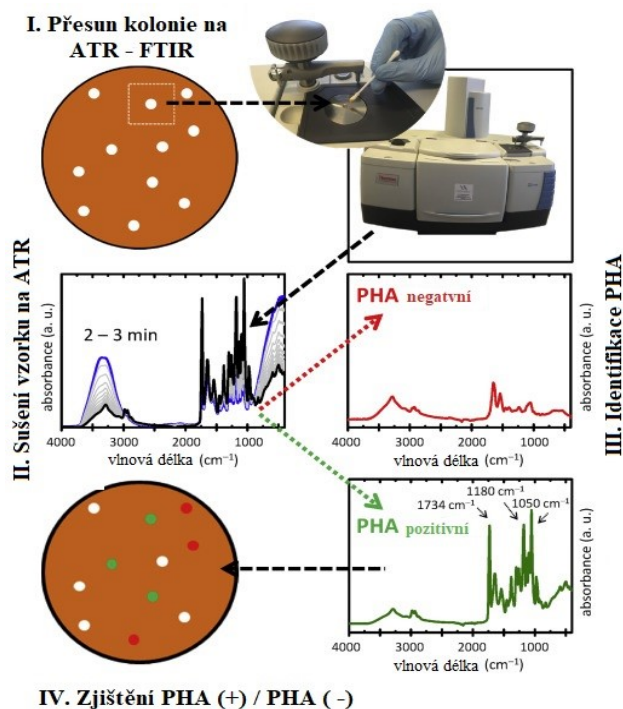
Spektrofotometrické metody obecně slouží ke kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení. Společným rysem metod je získání detailní struktury vzorku. Podkladem pro následující metody je skutečnost, že P(3HB) molekula je při zahřívání v roztoku kyseliny sírové degradována na kyselinu krotonovou a obsah biopolymeru v buňce lze následně stanovit pomocí schopnosti absorbovat UV záření o vlnové délce 235 nm právě kyselinou krotonovou. [52].

Infračervená spektrometrie (IR) je založena na absorpci záření vzorkem, kdy zdrojem osvitu je infračervené záření o vlnové délce v rozmezí 0,8 -1000  $\mu\text{m}$  v závislosti na použité oblasti. Při analýze PHA se využívá molekula P(3HB), která má v infračerveném spektru vysoký absorpční vrchol. P(3HB) se extrahuje pomocí chloroformu a obsah biopolymeru se stanoví z absorbance karbonylového pásu. Citlivost detekce je stanovena na 50  $\mu\text{g/ml}$  [51].

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je rychlá metoda pro detekci bakteriálních polyhydroxyalkanoátů v neporušených buňkách. FTIR spektra čistého PHA obsahují krátké řetězce monomeru jako je hydroxybutyrát (HB) a řetězce střední délky v podobě monomeru hydroxyoktanoátu (HO), hydroxydekanátu (HD) a další. Tyto monomery jsou silně charakterizovány při pásech 1728  $\text{cm}^{-1}$ , 1740  $\text{cm}^{-1}$  a 1732  $\text{cm}^{-1}$ . Analýza umožňuje použití malého množství vzorku a je vhodná pro screening velkého množství kolonií a schopnosti biosyntézy různých typů PHA. Existují modifikace této techniky jako je

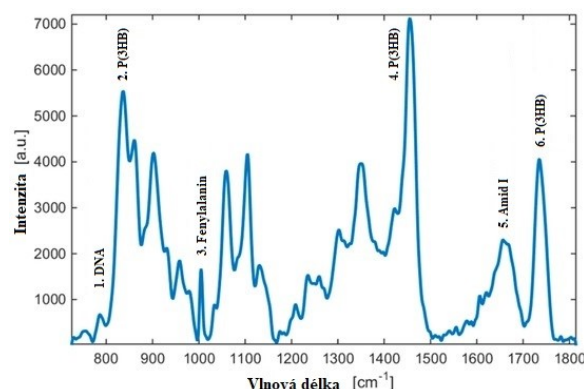


například ATR-FTIR, s celkovým oslabeným odrazem, která je znázorněna na obrázku 7 [51, 52].



**Obrázek 7:** Postup při analýze pomocí ATR-FTIR [50].

Dále lze jmenovat také Ramanovu spektroskopii, která má mezi analytickými metodami mimořádné postavení, především v biotechnologických směrech. Jedná se o bezkontaktní, neinvazivní a rychlou analýzu. Principem je ozáření vzorku monochromatickým zářením z laserového zdroje a následné měření odezvy molekul v něm. Odezvou je záření, které vzorek rozptýlil a také změna jeho vlnové délky. Výsledné Ramanovo spektrum buňky obsahující P(3HB) vykreslí některé charakteristické emisní vrcholy znázorněné na obrázku 8, které vypovídají o běžných buněčných komponentech. Zobrazí například DNA (fosfodiesterová vazba při  $786\text{ cm}^{-1}$ ), proteiny (fenylalanin při  $1005\text{ cm}^{-1}$ ), amid I ( $1662\text{ cm}^{-1}$ ) a lipidy (C–H vibrace při  $1449\text{ cm}^{-1}$  nebo  $1301\text{ cm}^{-1}$ ). PHB poskytuje hned několik Ramanových píků ( $837$ ,  $1455$  a  $1736\text{ cm}^{-1}$ ), které lze použít pro identifikaci a následnou analýzu P(3HB). Jako nejvhodnější se jeví  $1736\text{ cm}^{-1}$ , jelikož ostatní přítomné složky bakteriálních buněk neinterferují s touto emisní oblastí. K přípravě vzorku není třeba rozpouštědla, technika nepoužívá žádné formy markerů a dochází zde k minimální interferenci vodou. Jeli však potřeba vzorek rozpustit, je možné použít vodu a měřit tak vodné roztoky [53].



**Obrázek 8:** Ramanovo spektrum při analýze P(3HB) molekul v bakteriálních buňkách [53].

### 2.7.3 Chromatografické metody

Chromatografie patří mezi nejpoužívanější dostupné metody pro kvantitativní analýzu. GC – stanovení pomocí plynové chromatografie je založeno na tom, že se buňky podrobí přímé mírně kyselé nebo alkalické hydrolyze a poté následuje plynová chromatografie vzniklého metylesteru z PHA. Metodu lze modifikovat například použitím propanolu a HCl, kdy dochází k menší degradaci. Často se používá GC-MS/FID neboli plynová chromatografie s hmotnostní spektrofotometrií/plamenovým ionizačním detektorem. Dále je také možné použít HPLC – vysokotlaké kapalinové chromatografie. Principem této metody je kvantitativní převedení P(3HB) na kyselinu krotonovou, která je následně distribuována iont-měničovou HPLC kolonou a je detekována při vlnové délce 210 nm. Jedná se o rychlou a spolehlivou chromatografickou techniku, která je schopna ve vzorcích detekovat kyselinu krotonovou o obsahu 0,01 -14  $\mu\text{g}$  [51, 52].

### 2.7.4 Ostatní metody

Dále je možno využít NMR – nukleární magnetickou rezonanci, která stanovuje složení a obsah hydroxyalkanoátových monomerů především u kopolymerů. Výhoda NMR spočívá v tom, že se lze vyvarovat hydrolyzy biopolymeru. Při NMR analýze je 2-5 mg vzorku kopolymeru rozpuštěno v deuteriovém chloroformu. Využívá se také průtoková cytometrie, kdy na základě rozptylu světla při osvětlování jednotlivých buněk laserem můžeme určit, zdali buňka obsahuje P(3HB) nebo ne. Pro optimalizaci a kontrolu biotechnologické produkce PHA, lze v reálném čase během kultivace sledovat koncentraci produktu k čemuž byla upravena a slouží například spektrofotometrie. Tato metoda je založena na fluorescenčním jevu, kdy se nejčastěji používá barvivo obsahující fluorofory. Barvivo má lipofilní charakter a po jeho aplikaci dochází k navázání fluorescenční sondy na lipidové buněčné struktury. Tento mechanismus pak slouží k zobrazení P(3HB) granulí akumulovaných v bakteriálních buňkách [51].



### 3 Experimentální část

#### 3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

##### 3.1.1 Mikroorganismy

V experimentální části bakalářské práce byly použity tři bakteriální kmeny izolované z volné přírody. První dva izoláty pochází z ČOV v Brně – Modřicích a nesou označení **34** a **35**. Posledním izolátem je kmen z kompostárny v Blansku s označením **BŽ**.

##### 3.1.2 Chemikálie pro kultivaci

- Citrát amonno-železitý (Fluka, Švýcarsko)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, ČR)
- D-glukóza monohydrát, p.a. (LachNer, ČR)
- Glycerol bezvodý, p.a. (LachNer, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p.a. (LachNer, ČR)
- Chlorid amonný (LachNer, ČR)
- Chlorid sodný, p.a. (LachNer, ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát, p.a. (Lachema, ČR)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, Indie)
- Nutrient broth (HiMedia, Indie)
- Sacharóza (LachNer, ČR)
- Síran hořečnatý heptahydrát, p.a. (LachNer, ČR)

##### 3.1.3 Chemikálie pro utilizaci uhlíkatých zdroj

- Fruktóza (LachNer, ČR)
- Galaktóza (LachNer, ČR)
- D-glukóza monohydrát p.a. (LachNer, ČR)
- Glycerol bezvodý, p.a. (LachNer, ČR)
- Laktóza monohydrát (LachNer, ČR)
- Manóza (Sigma-Aldrich, Německo)
- Sacharóza (LachNer, ČR)
- Škrob (LachNer, ČR)
- Xylóza (LachNer, ČR)

##### 3.1.4 Komponenty pro izolaci DNA, PCR a agarózovou elektroforézu

- Agaróza (Serva, SRN)
- DNA Ladder – s fragmenty o délce 3000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp (Nippon Genetics Europe, EU)
- Etyléndiamíntetraacetát sodný (Lach-Ner, ČR)
- Glycerol (Lachema, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, ČR)
- Master mix One Taq Hot Start (2x koncentrovaný) (New England BioLabs, UK)
- MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, USA)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, SRN)
- PCR loading buff, Yellow load (Top-Bio, UK)
- Primery pro *16S rRNA* (16S-F, 16S-R)
- Primery pro *phaC* I a II (G-D, G1-R)
- Primery pro *phaC* IV (phaCAb-F, phaCAb-R)

- Tris (hydroxymetyl) aminometán (Lach-Ner, ČR)

### 3.1.5 Komponenty pro fluorescenční spektroskopii

- Chlorid sodný (Lachner, ČR)
- Chlorid draselný (Lachner, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lachner, ČR)
- BodiPy

### 3.1.6 Přístroje

- analytické váhy PA224C – Pioneer (Švýcarsko)
- běžné laboratorní sklo a vybavení
- blokový termostat Stuart SBH 200D
- centrifuga U-32R – Boeco (Německo)
- ELISA reader, BioTek, ELx808 (Německo)
- laminární box Aura mini, BioAir – Euroclone (Spojené státy americké)
- magnetická míchačka, Kartell, TKO (Spojené státy americké)
- nanofotometr, Implen, P300 (UK)
- plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm (Nizozemí)
- spektrometr MicroTime 200 (Německo)
- temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000 (ČR)
- thermo-cycler MyCycler™ – BIO-RAD
- váhy Kern EW 620-3NM (Německo)

## 3.2 Kultivace mikroorganismů

Kmeny bakteriálních izolátů byly kultivovány nejprve v inokulačním a poté na produkčním médiu. Jejich následné uchování probíhalo v kryokonzervách s obsahem 10% roztoku glycerolu a uskladněny byly v mrazicím boxu.

### 3.2.1 Příprava inokulačního média

Inokula pro všechny bakteriální kmeny byla připravena v objemu 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Následná kultivace probíhala na temperovaných třepačkách při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Jako univerzální živné médium byl použit Nutrient Broth:

- |                    |         |
|--------------------|---------|
| • Hovězí extrakt   | 10,00 g |
| • Pepton           | 10,00 g |
| • NaCl             | 5,00 g  |
| • Destilovaná voda | 1000 ml |

Živné médium bylo důkladně rozpuštěno v destilované vodě a následně sterilováno. Po sterilizaci bylo médium lehce ochlazeno a zaočkováno z kryozkumavek. Očkování bylo prováděno ve sterilním laminárním boxu pomocí automatické pipety, kdy byla kultura z kryozkumavky přenesena do inokulačního média a následně kultivována na temperované třepačce. Zaočkování probíhalo v paralelním provedení.

### 3.2.2 Příprava produkčního média

K inokulaci produkčního média bylo využito inokulum o stáří 24 h. Z bakteriálního inokula bylo 10 ml kultury přeočkováno do produkčního média, které zabíralo objem 100 ml ve 250

Erlenmeyerových baňkách. Pro produkci bylo použito minerální médium s obsahem uhlíku a stopových prvků. Médium bylo připraveno pro každý kmen ve dvou paralelních provedeních, sterilizováno, mírně ochlazeno a obsahovalo následující složení:

• $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9,00 g
• $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,50 g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
• $\text{NH}_4\text{Cl}$	1,00 g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
• $\text{Fe(III)NH}_4$ – citrát	0,0012 g
• Kvasničný extrakt	0,50 g
• Zdroj uhlíku *	20,00 g
• Roztok TES *	1,00 ml
• Destilovaná voda	1000 ml

Složení roztoku stopových prvků TES:

• EDTA	50,00 g
• $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	13,80 g
• $\text{ZnCl}_2$	0,84 g
• $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,13 g
• $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
• $\text{H}_3\text{BO}_3$	0,10 g
• $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,016 g
• Destilovaná voda	1000 ml

Pro bakteriální kmen 34, 35 byla jako zdroj uhlíku použita glukóza o koncentraci 20 g/l a pro izolat BŽ byl zdrojem uhlíku glycerol s koncentrací 20 g/l. Přídavek uhlíkatých zdrojů a roztoku TES s obsahem stopových prvků byl prováděn až po sterilizaci produkčního média. Po přeočkování z inokulačního média následovala kultivace po dobu 72 h při teplotě 50 °C na temperovaných třepáčkách s hodnotou 180 rpm.

### 3.3 Příprava roztoků

#### 3.3.1 Lyzační pufr

Tris-(hydroxymethyl)aminomethan o hmotnosti 0,060 g byl rozpuštěn v 80 ml destilované vody a poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,5 pomocí HCl. Následně byl objem doplněn do 100 ml a takto vzniklý roztok byl vysterilizován. Nakonec byl hotový roztok zamražen a uchován pro následující použití.

#### 3.3.2 TBE pufr pro gelovou elektroforézu

Pro přípravu 10x koncentrovaného TBE pufru bylo použito:

• $\text{H}_3\text{BO}_3$	55,00 g
• EDTA	9,30 g
• tris-(hydroxymethyl)aminomethan	108,00 g
• Destilovaná voda	1000 ml

### 3.3.3 Příprava fosfátového pufru (PBS)

Pro přípravu PBS pufru bylo použito:

- |  |         |
|--|---------|
| • NaCl   | 8,00 g  |
| • Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 1,44 g  |
| • KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0,24 g  |
| • KCl  | 0,20 g  |
| • Destilovaná voda                                     | 1000 ml |

### 3.3.4 Agarózový gel pro elektroforézu

K navážce agarózy o hmotnosti 2 g byl přidán připravený roztok 1x koncentrovaného TBE pufru o objemu 100 ml. Poté byla připravená směs několikrát obezřetně zahřívána v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Následovalo ochlazení směsi, přidání 5 µl Midori Green a usazení hřebínku pro tvorbu jamek. Poté došlo k opatrnému přelití gelu do formy tak, aby se zde nevytvořily vzduchové polštáře. Po zatuhnutí gelu byl hřebínek pro tvorbu jamek opatrně vyjmut a následovalo umístění gelu do elektroforetické nádoby.

## 3.4 Použité metody

### 3.4.1 Molekulárně biologické techniky

Molekulárně biologické techniky sestávají z izolace bakteriální DNA, polymerázové řetězcové reakce a gelové elektroforézy.

#### 3.4.1.1 Izolace bakteriální DNA pomocí tepelné lyze

Do čisté Eppendorfovy zkumavky bylo napipetováno 100 µl lyzačního pufru. Poté byla pomocí jednorázové mikrobiologické kličky v lyzačním pufru rozsuspendednována kultura přenesená z Petriho misky a poté byla takto připravená směs inkubována v termobloku při 98 °C po dobu 10 minut. Následně byla mikrozkušavka centrifugována při 10 000 rpm po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl pipetován do nových Eppendorfových zkumavek v objemu 60 µl.

#### 3.4.1.2 Stanovení čistoty bakteriální DNA pomocí spektrofotometru

Čistota DNA v lyzátech byla měřena pomocí nanofotometru. Principem této metody je měření absorbance při vlnové délce 260/280 nm oproti blanku v podobě čistého lyzačního pufru. Vzorek DNA byl měřen v objemu 1 µl, kdy následně byla odečtena hodnota koncentrace DNA v ng/µl a pro stanovení čistoty DNA byl použit poměr A260/A280. Ideální poměr čistoty by se měl blížit hodnotě 1,800. Pokud je tato hodnota nižší, značí to znečištění vzorku proteiny, a naopak vyšší hodnota signalizuje přítomnost RNA.

#### 3.4.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Dalším krokem byla příprava PCR směsi. Polymerázová řetězová reakce slouží k amplifikaci fragmentů DNA o velikosti 1500 bp. Pro potvrzení bakteriální DNA byli použity primery *16S-F* a *16S-R*, které slouží pro potvrzení přítomnosti *16S rRNA* genu. Zároveň byla provedena také amplifikace fragmentů DNA o velikosti 551 bp pomocí primerů *G-D* a *G1-R*. Tyto primery slouží k selektivní amplifikaci *phaC* genu, který kóduje syntázu třídy I a II. U každé reakce byla proveden také pozitivní a negativní kontrola. U pozitivní kontroly byla použita DNA mikroorganismu *Cupriavidus necator H16*, u kterého je hledaný gen potvrzen. Pro negativní kontrolu byl vzorek DNA nahrazen vodou. Taktéž byla zjišťována přítomnost *phaC* genu kódujícího syntázu třídy IV. K tomuto účelu byly použity primery *phaCAB-F* a *phaCAB-R* amplifikující DNA fragmenty o velikosti 299 bp. Opět byla provedena pozitivní (DNA

mikroorganismu z rodu *Aneurinibacillus* pro potvrzení genu) a negativní kontrola (DNA nahrazena vodou). Sekvence primerů jsou zobrazeny v tabulce 4.

**Tabulka 4:** Sekvence bází primerů použitých při PCR.

Gen	Velikost [bp]	Primer	Sekvence bází
<i>16S rRNA</i>	1500	16S-F	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
		16S-R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>phaC</i> (I a II)	551	G-D	GTG CCG CCS YRS ATC AAC AAG T
		G1-R	GTT CCA GWA CAG SAK RTC GAA
<i>phaC</i> (IV)	299	phaCAB-F	ACA CTG GGT ATC ATT CCA CCG G
		phaCAB-R	GCG GCA ATG TTT AGC ACG TTT G

Směs pro PCR o celkovém objemu 25 µl, která amplifikovala gen *16S rRNA* a *phaC* (I a II) byla složena z:

- Mastermix 12,50 µl
- Primery (16S-F, 16S-R, G-D, G1-R) 4 x 1,00 µl
- DNA 2,00 µl
- Mg<sup>2+</sup> 2,60 µl
- Sterilní voda 5,90 µl

Směs pro PCR o celkovém objemu 25 µl, která amplifikovala gen *phaC* (IV) byla složena z:

- Mastermix 12,50 µl
- Primery (phaCAB-F, phaCAB-R) 2 x 2,00 µl
- DNA 2,00 µl
- Mg<sup>2+</sup> 2,60 µl
- Sterilní voda 5,90 µl

Pro PCR amplifikaci první směsi (*16S rRNA* a *phaC* I+II) byl použit termocycler s teplotním programem uvedeným v tabulce 5. U druhé PCR směsi (*phaC* IV) byla pro nasedání primerů použita teplota 65 °C.

**Tabulka 5:** Teplotní program termocycleru použitého při PCR.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
1	94	30	1
2	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3	68	30	1
	30	600	1

#### 3.4.1.4 Stanovení přítomnosti ampliconů pomocí gelové agaróзовé elektroforézy

Po proběhnutí PCR byla stanovena přítomnost ampliconů pomocí gelové elektroforézy. Do jamek připraveného 2% agaróзовého gelu byla napipetována směs o objemu 10 µl složená ze 3 µl nanášecího pufru a 10 µl vzorku PCR produktu. Zároveň bylo do jedné z jamek nanášeno 5 µl DNA žebříčku s definovanou velikostí fragmentů. Následně byl vložený gel v elektroforetické vaně převrstven 1x koncentrovaným TBE pufrem. Poté byla aparatura připojena ke zdroji napětí a při 90 V probíhala elektroforéza po dobu 80 minut. Po skončení byl gel vyjmut a pozorován pod UV transiluminátorem.

#### 3.4.1.5 Příprava izolátů pro sekvenaci

Nejprve byla provedena izolace DNA jednotlivých izolátů pomocí tepelné lyze. Následně byla aplikována PCR metoda, kdy byly použity pouze primery *16S-F* a *16S-R* ke zmnožení úseku bakteriální DNA, který byl odeslán na sekvenaci. Před odesláním na sekvenaci byly produkty přečištěny pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu. Sekvence byla provedena firmou SEQme s.r.o. a výsledky byly vyhodnoceny programem BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3.4.2 Optimalizace produkce PHA

Metoda optimalizace PHA zahrnovala výběr vhodného uhlíkatého substrátu a teploty pro dosažení maximální produkce. Také byla sledována schopnost produkce kopolymerů pomocí vhodných prekurzorů.

#### 3.4.2.1 Stanovení utilizace uhlíkatých zdrojů

Minerální produkční médium 2,0 x koncentrované a obsahující stopové prvky bylo pomocí multikanálové pipety napipetováno do jamek mikrotitrační destičky v objemu 100 µl. Do těchto médií bylo následně přidáno 50 µl příslušného substrátu o dané koncentraci, které jsou uvedeny v tabulce 6. Nakonec bylo takto připravených jamek zaočkováno 20 µl inokula a destička byla umístěna na ELISA reader, kde došlo k proměření vstupních hodnoty absorbance při vlnové délce 630 nm. Poté byla destička s kulturami kultivována při teplotě 50 °C po dobu 72 h a po skončení kultivace bylo znovu proměřeno OD630 nm. Všechny substráty byly připraveny v triplicátech.

Tabulka 6: Seznam a koncentrace použitých substrátů.

Koncentrace [g/l]	20
Substrát	Fruktóza
	Galaktóza
	Glukóza
	Glycerol
	Laktóza
	Manóza
	Sacharóza
	Škrob
	Xylóza

#### 3.4.2.2 Stanovení optimální teploty

Pro stanovení optimální teploty produkce PHA jednotlivých kultur probíhala kultivace při čtyřech různých teplotách za použití nejvhodnějších substrátů. Inokulační kultury byly na třepačce vždy kultivována při teplotě 50 °C po dobu 24 h. Následně bylo připraveno produkční

minerální médium s vhodným substrátem o koncentraci 20g/l. Kultivace produkčních médií probíhala opět na třepačce při různých teplotách po dobu 72 h. Následně bylo vyprodukované PHA analyzováno pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Testované teploty byly 45, 50, 55, a 60 °C

### 3.4.2.3 Nalezení vhodných prekurzorů pro podpoření produkce kopolymerů

K nalezení vhodných prekurzorů uvedených v tabulce 7 sloužících především pro zvýšení produkce PHA, a především pro podpoření tvorby kopolymerů 3-hydroxyvalerátu a 4-hydroxybutyrátu byla inokulační média kultivována za stejných podmínek jako v předchozích experimentech. Poté byl do minerálního produkčního média v případě použití prekurzorů propionátu a valerátu přidán ještě uhlíkatý substrát o koncentraci 20g/l. Při použití 1,4-butandiolu a  $\gamma$ -butyrolaktonu substrát přidán nebyl. Následná kultivace probíhala na třepačce při teplotě 50 °C a po dobu 72 h. Nakonec byla přítomnost PHA a kopolymerů analyzována opět pomocí GC-FID.

**Tabulka 7:** Seznam a koncentrace použitých prekurzorů.

Koncentrace [g/l]	8	2
Prekurzor	1,4-butandiol	Propionát
	$\gamma$ -butyrolakton	Kyselina valerová

### 3.4.3 Stanovení obsahu biomasy

Po kultivaci následovalo stanovení množství biomasy gravimetrickou a spektrofotometrickou metodou. Poté byl stanoven obsah PHA v biomase.

#### 3.4.3.1 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Pro gravimetrické stanovení obsahu biomasy bylo z produkčního média do centrifugační zkumavky odebráno 10 ml narostlé kultury. Centrifugace probíhala při 6000 rpm po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl odlit a k sedimentu biomasy bylo přidáno 5 ml destilované vody. Pomocí vortexu se biomasa promyla a rozsuspendovala. Následovala centrifugace se stejnými parametry, poté byla přebytečná voda slita a vzorky byly sušeny do konstantní hmotnosti. Po vysušení byla biomasa zvážena na analytických vahách a uschována pro další analýzu. Vzorky byly připraveny v paralelním provedení.

#### 3.4.3.2 Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy

Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy bylo prováděno pomocí měření intenzity zákalu při vlnové délce 630 nm. Měřilo se v plastové kyvetě oproti destilované vodě. Vzorky odebrané z produkčního média byly vždy vhodně naředěny destilovanou tak, aby naměřená absorbance nepřesahovala hodnotu 1. Výsledná směs vzorku a vody v objemu 3 ml byla napipetována do kyvety a proměřena ve třech paralelních provedeních. Poté byla stanovena průměrná hodnota absorbance, vypovídající o množství biomasy ve vzorku.

### 3.4.4 Analýza množství a složení PHA v biomase

Kvantitativní a kvalitativní stanovení PHA v biomase bylo provedeno pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Principem této metody je přeměna PHA obsaženého v biomase na metylester  $\beta$ -hydroxykarboxylové kyseliny za přispění kyselého katalyzovaného esterifikace.

#### 3.4.4.1 Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie

Vysušená biomasa byla pomocí analytických vah navážena do krimpovacích vialek v rozmezí hmotnosti 8-12 mg a následně rozpuštěna v 1 ml chloroformu. Poté bylo do vialek přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi – 15 % kyselina sírová v methanolu s vnitřním standardem kyselinou benzoovou o koncentraci 5 mg/ml. Následně byly vialky zavíčkované, protřepány a umístěny do termobloku, kde probíhala esterifikace při teplotě 94 °C po dobu 3 h. Po proběhnutí esterifikace byla směs ochlazená a extrahována v 0,5 ml 0,05M NaOH. Vialky byly protřepány a ponechány k ustálení, po kterém došlo k vytvoření rozhraní dvou fází. Do nových vialek bylo napipetováno 900 µl chloroformu a taktéž 50 µl spodní fáze. Vialky byly následně uzavřeny a analyzovány pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem. Analýza opět probíhala ve dvou paralelních provedeních. Získané výsledky byly zpracovány pomocí programu EXCEL.

#### 3.4.5 Screening PHA granulí pomocí fluorescenční spektroskopie

Pro ověření přítomnosti PHA v bakteriálních buňkách byla použita také fluorescenční spektroskopie. Vizualizace probíhala na spektroskopu *MicroTime 200* s komponenty:

- Excitační zdroj: Laser Diode Head LDH – 470nm (frekvence 40 MHz)
- Objektiv: UPLSAPO (60x vodní imerze)
- Emisní filtr: 520/35
- Detektor: SPCM-AQRH
- Pinhole: 50 mikrometrů
- Software: SymphoTime64

##### 3.4.5.1 Příprava vzorků pro fluorescenční spektroskopii

Po kultivaci byl odebrán do sterilní Eppendorfovy zkumavky 1 ml vzorku. Následně byl vzorek centrifugován při 6000 rpm po dobu 5 min, vzniklý supernatant byl slit a do zkumavky byl přidán 1 ml předem připraveného PBS pufru, který byl temperován na teplotu 50 °C. Poté byla směs rozsuspendednována pomocí vortexu, opět stočena při stejných hodnotách a došlo k odlití supernatantu. Na závěr byl znovu přidán 1 ml PBS pufru, směs byla rozsuspendednována a do zkumavky bylo přidání fluorescenční barvivo s označením BodiPy 493/503 v objemu 0,5 µl s koncentrací 0,5 µl/ml . Takto připravené vzorky bylo udržovány v teple a analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie.



## 4 Výsledky a diskuse

V experimentální části se nám podařilo dosáhnout zajímavých výsledků, které jsou diskutovány dále v textu. Na začátku jsou rozebrány výsledky získané pomocí molekulárně biologických metod a poté následuje výsledková část z oblasti optimalizace produkce PHA pro jednotlivé izoláty. V závěru jsou uvedeny vizualizace izolátů, kterých bylo dosaženo za pomoci fluorescenční spektroskopie.

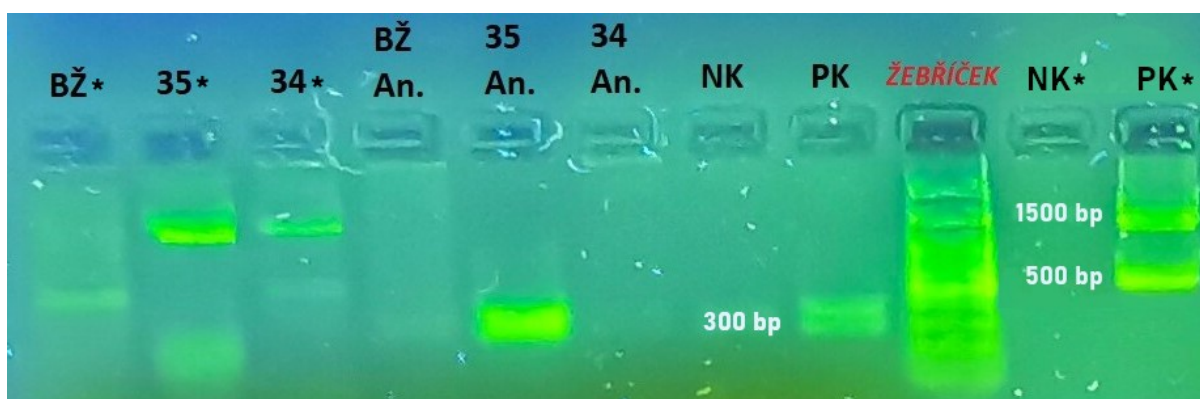
### 4.1 Identifikace *phaC* genu pomocí PCR

Za použití molekulárně biologické metody – konkrétně polymerázové řetězové reakce byla zjišťována schopnost bakteriálních kultur produkovat PHA. Multiplex PCR umožňuje amplifikovat bakteriální gen *16S rRNA* a gen *phaC*. *16S rRNA* gen byl stanovován z důvodu kontroly samotné izolace. Detekce *phaC* genu sloužila k potvrzení schopnosti produkce PHA. Izolace DNA pro PCR proběhla pomocí tepelné lyze a následně byla proměřena na nanofotometru její čistota. Čistota byla odečtena dle poměru A260/A280 nm.

**Tabulka 8:** Hodnoty koncentrace a čistoty DNA jednotlivých izolátů.

Izolát	A260/A280 [-]
34	1,727 ± 0,300
35	1,469 ± 0,175
BŽ	1,471 ± 0,043

Z tabulky 8 lze porovnat míru čistoty DNA jednotlivých izolátů. Ideálně by se poměr A260/A280 měl blížit hodnotě 1,800 což je v případě izolátu 34 splněno a zbylé dva izoláty lehkou míru znečištění reflektují. Tento jev mohl být způsobený použitím vysoké lyzační teploty, která může DNA poškodit a nastane tak úbytek koncentrace a míry čistoty. Čistota DNA je primárně orientační, aby nedocházelo k používání vzorků s velkou mírou nečistot, které by mohly negativně ovlivnit následnou PCR a elektroforézu.



**Obrázek 9:** BŽ\*, 35\*, 34\* - vzorky z Multiplex PCR; NK\* - negativní kontrola, PK\* - pozitivní kontrola; BŽ(An.), 35(An.), 34(An.) – vzorky z PCR pro stanovení PHA syntázy třídy IV; NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola.

Na obrázku 9 jsou výsledky z gelové elektroforézy. Při použití multiplex PCR vykazuje pozitivní kontrola (*Cupriavidus necator* H16 CCM 3726) jasné zóny při zhruba 1500 bp, které charakterizují přítomnost genu *16S rRNA*, jež je přítomen ve všech bakteriích. Také jsou zde viditelné zóny při 500 bp, které naopak detekují přítomnost *phaC* genu. V první sadě vzorků byly použity primery pro amplifikaci genu *16S rRNA* a *phaC*. Z výsledků je viditelné, že

u izolátu 34 došlo k potvrzení přítomnosti genu *phaC*, který kóduje PHA syntázu první třídy a také je zde přítomen gen *16S rRNA*. Izolát 35 vykazuje přítomnost pouze genu *16S rRNA*, tudíž *phaC* gen pro PHA syntázu první třídy postrádá. BŽ izolát obsahuje *phaC* gen a přítomnost genu *16S rRNA* zde není detekována. V tomto případě došlo s největší pravděpodobností k preferenční amplifikaci kratšího fragmentu, což je běžný důsledek multiplex PCR.

Druhá sada vzorků byla připravena pomocí PCR směsi pro stanovení PHA syntázy čtvrté třídy. Pozitivní kontrola (*Aneurinibacillus sp.* H1 CCM 8960) v tomto případě ukazuje zřetelnou zónu při 300 bp, který detekuje přítomnost *phaC* genu kódujícího PHA syntázu čtvrté třídy. Izoláty 34 a BŽ nevykazují žádnou odezvu. Naopak u izolátu 35 je zřetelně detekována přítomnost právě *phaC* genu pro již zmíněnou PHA syntázu čtvrté třídy.

Z první sady vzorků lze tedy usoudit, že izoláty 34 a BŽ by měly být schopny produkovat PHA na základě přítomnosti PHA syntázy první třídy. Druhá sada vzorků prokázala, že izolát 35 by měl být taktéž schopen produkce PHA z důvodu přítomnosti PHA syntázy čtvrté třídy. Zjištěné předpoklady byly dále prověřeny na úrovni fenotypu pomocí produkčních experimentů.

## 4.2 Identifikace izolátů pomocí DNA sekvenace

Izolovaná bakteriální DNA z každého vzorku byla připravena k sekvenaci a odeslána do firmy SEQme s.r.o., která sekvenování prováděla. Shody s referenčními sekvenacemi se podařilo dosáhnout u všech izolátů. V prvních dvou případech byly izoláty zařazeny na úrovni rodové a druhové, avšak třetí vzorek má horší identifikační genetickou shodu a díky tomu je zařazen pouze na úrovni druhové. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9 včetně kódu pod kterým jsou získané sekvenace uloženy v NCBI.

**Tabulka 9:** Výsledky sekvenace a identifikace izolátů.

Izolát	Druh	Shoda s referenční sekvenací	NCBI
34	<i>Chelatococcus composti</i>	99,84%	MN596015
35	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	99,85%	MN596016
BŽ	<i>Paenibacillus sp.</i>	82,84%	-

Izoláty 34 a 35 pocházející z ČOV – Modřice byly identifikovány na základě sekvenace genu *16S rRNA* jako *Chelatococcus composti* a *Aneurinibacillus thermoaerophilus*. Izolát BŽ původem z kompostárny v Blansku byl identifikován pouze z části a byl předběžně zařazen do rodu *Paenibacillus*.

## 4.3 Optimalizace podmínek pro produkci

V první části práce byla u všech izolátů detekována přítomnost *phaC* genu, a tudíž predikce pro schopnost produkce PHA byla potvrzena. V následující části jsme se věnovali optimalizaci podmínek pro růst jednotlivých izolátů a produkci P(3HB). Soustředili jsme se na nalezení nejvhodnějšího zdroje uhlíku, optimální růstové teploty a také byl proveden screening produkce kopolymerů za účasti různých prekurzorů.

### 4.3.1 Schopnost utilizace vybraných substrátů

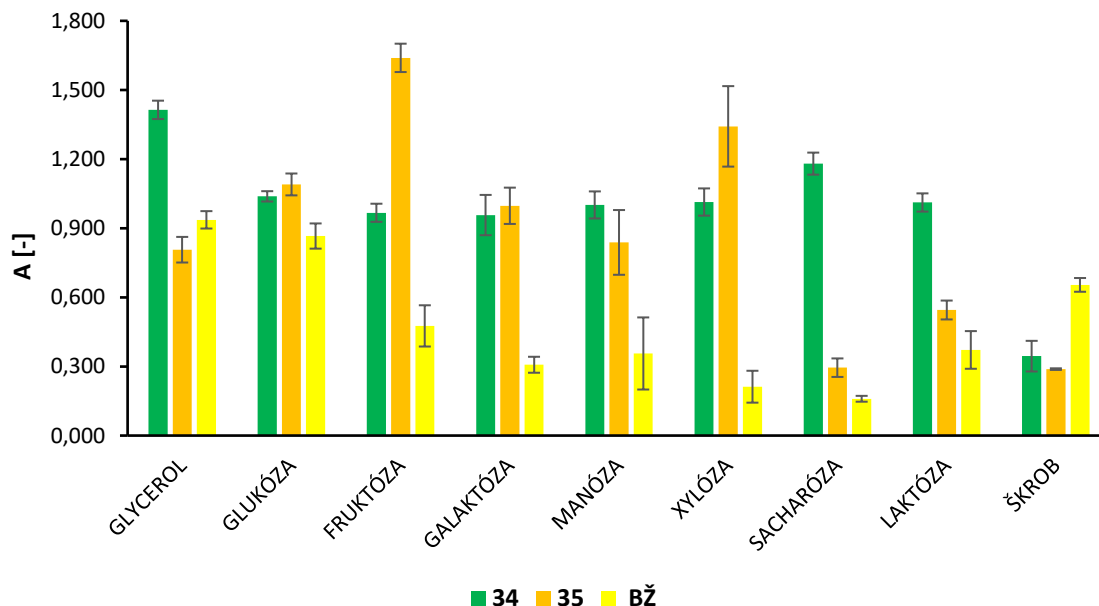
Prvním krokem v optimalizaci produkce bylo sledování schopnosti utilizace vybraných substrátů při submerzní kultivaci po dobu 72 h. Sledován byl nárůst jednotlivých izolátů na

konkrétním substrátu pomocí proměření intenzity zákalu na počátku a konci kultivace. Intenzita zákalu byla měřena na mikrotitrační destičce (1.11.2.1) v čase 0 a 72h při vlnové délce 630 nm pomocí ELISA readeru a výsledkem utilizace je pak rozdíl těchto dvou měření s hodnotami obsaženými v tabulce 10. Jako substráty byly použity především sacharidové zdroje (fruktóza, galaktóza, glukóza, laktóza, manóza, sacharóza, škrob, xylóza) a glycerol.

**Tabulka 10:** *Výsledky schopnosti utilizace vybraných substrátů jednotlivými izoláty.*

Substrát	Izolát			A [-]
	34	35	BŽ	
Glycerol	1,414 ± 0,040	0,807 ± 0,056	0,936 ± 0,038	
Glukóza	1,038 ± 0,022	1,090 ± 0,047	0,866 ± 0,055	
Fruktóza	0,967 ± 0,039	1,639 ± 0,062	0,476 ± 0,090	
Galaktóza	0,957 ± 0,087	0,997 ± 0,079	0,307 ± 0,035	
Manóza	1,001 ± 0,059	0,838 ± 0,141	0,356 ± 0,157	
Xylóza	1,014 ± 0,059	1,342 ± 0,175	0,212 ± 0,069	
Sacharóza	1,180 ± 0,048	0,295 ± 0,040	0,160 ± 0,013	
Laktóza	1,012 ± 0,040	0,545 ± 0,041	0,372 ± 0,082	
Škrob	0,209 ± 0,067	0,288 ± 0,003	0,654 ± 0,030	

Z obrázku 10 je patrné, že největší nárůst v rámci všech izolátů byl zaznamenán na glukóze a glycerolu, a tudíž můžeme očekávat, že by tyto substráty nakonec mohly být vybrány jako nejvhodnější. Jednotlivě pak izolát 34 dále vykazuje velký nárůst na sacharóze či fruktóze, v případě izolátu 35 se jedná o fruktózu a xylózu. Izolát BŽ zaznamenal ze všech kultur nárůst nejmenší a největšího nárůstu bylo dosaženo při použití fruktózy a škrobu.



**Obrázek 10:** *Grafické porovnání intenzity zákalu pro jednotlivé substráty a izoláty.*

Pro sjednocení substrátů a další použití byly nakonec vybrány tyto substráty pro jednotlivé izoláty: 34 (glycerol, glukóza, sacharóza), 35 (glukóza, fruktóza, xylóza) a BŽ (glycerol,

glukóza, fruktóza). Tato skladba substrátů byla následně přenesena do plnohodnotných produkčních experimentů za účelem identifikaci optimálního zdroje uhlíku.

#### 4.3.2 Výběr optimálního zdroje uhlíku

Po vybrání vhodné skladby substrátů při utilizaci následovala produkce v Erlenmeyerových baňkách. Jednotlivé izoláty byly kultivovány po přidání vybraných substrátů o koncentraci 20 g/l do minerálního média při teplotě 50 °C po dobu 72 h. Po ukončení kultivace byla měřena optická hustota pomocí spektrofotometru a výsledky jsou uvedeny níže v tabulce 11.

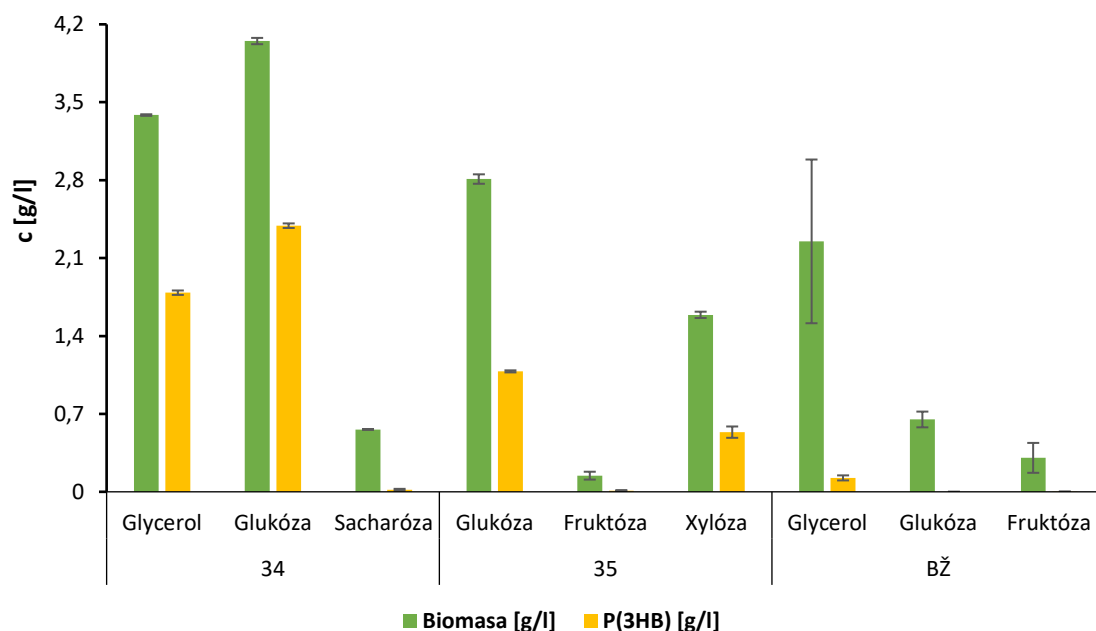
**Tabulka 11:** Stanovení optické hustoty pomocí spektrofotometru pro jednotlivé izoláty při různých zdrojích uhlíku.

Izolát	Zdroj uhlíku	OD 630 nm [-]
34	Glycerol	25,820 ± 0,069
	Glukóza	27,640 ± 1,094
	Sacharóza	5,980 ± 0,367
35	Glukóza	24,260 ± 0,399
	Fruktóza	4,480 ± 0,227
	Xylóza	17,100 ± 0,393
BŽ	Glycerol	11,280 ± 1,270
	Glukóza	6,460 ± 1,310
	Fruktóza	5,740 ± 0,964

Nejvyšší optická hustota byla naměřena při použití glukózy u izolátů 34 ( $27,640 \pm 1,094$ ) a 35 ( $24,260 \pm 0,399$ ). Izolát BŽ vykazoval největší optickou hustotu při glycerolu ( $11,280 \pm 1,270$ ). Následně byla stanovena koncentrace biomasy a P(3HB). Také byl stanoven obsah P(3HB) v sušině, který je zaznamenán v tabulce 12.

Po analýze dat získaných z GC-FID se podařilo získat výsledky, které jsou znázorněny na obrázku 11. Substráty glukóza a glycerol potvrdily dřívější predikce a vykazují největší koncentraci jak biomasy, tak P(3HB). Naopak fruktózu a sacharózu lze označit za nejméně vhodné zdroje uhlíku, jelikož u těchto substrátů bylo dosaženo velice nízké koncentrace polyhydroxyalkanoátů. V případě izolátu 34 bylo dosaženo největší koncentrace biomasy  $4,050 \pm 0,028$  při použití glukózy a taktéž je tomu u izolátu 35, který dosáhl koncentrace  $2,810 \pm 0,042$ . Izolát BŽ poté zaznamenal největší koncentraci  $2,250 \pm 0,735$  při použití glycerolu.

Největší koncentrace P(3HB) bylo dosaženo u izolátu 34 při kultivaci na glukóze ( $2,391 \pm 0,021$ ) a jeho obsah v sušině činí 59,04 %. U izolátu 35 byl při kultivaci na glukóze ( $1,082 \pm 0,009$ ) stanoven obsah P(3HB) v sušině na 33,69 %. Naopak nejnižší koncentrace P(3HB) bylo dosaženo při kultivaci izolátu BŽ na glycerolu ( $0,125 \pm 0,023$ ) se zastoupením P(3HB) v sušině pouze 5,55 %.



**Obrázek 11:** Grafické stanovení koncentrace biomasy a P(3HB) u jednotlivých izolátů při použití různých uhlíkatých zdrojů.

**Tabulka 12:** Obsah P(3HB) v sušině jednotlivých izolátů při použití různých substrátů.

Izolát	Substrát	Obsah P(3HB) v sušině [%]
34	Glycerol	52,85
	Glukóza	59,04
	Sacharóza	3,24
35	Glukóza	33,69
	Fruktóza	6,38
	Xylóza	38,50
BŽ	Glycerol	5,55
	Glukóza	-
	Fruktóza	0,38

Získané výsledky ukazují, že nejlepší produkční výsledky P(3HB) bychom mohli očekávat u izolátu 34 nebo 35 a izolát BŽ bude pravděpodobně vykazovat produkci nejnížší. Zdroje uhlíku v podobě fruktózy a sacharózy byly zcela vyloučeny. Zajímavým substrátem pro produkci by v případě izolátu 34 mohla být také xylóza, která se vyskytuje v lignocelulózových materiálech, je vedlejším produktem při výrobě biopaliv a hojně se využívá ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Jako nejvhodnější zdroj byl nakonec pro izolát 34 a 35 určena glukóza, pro izolát BŽ naopak glycerol. Tyto zdroje uhlíku byly používány ve všech dalších experimentech.

#### 4.3.3 Stanovení optimální teploty

Pro nalezení optimální teploty byla použita opět kultivace v minerálním médiu po dobu 72 h za přítomnosti vybraných uhlíkatých zdrojů o koncentraci 20 g/l. Jelikož se jedná o kultury izolované z termofilních prostředí, pro kultivaci jsme volily teploty 45, 50, 55 a 60 °C. Po

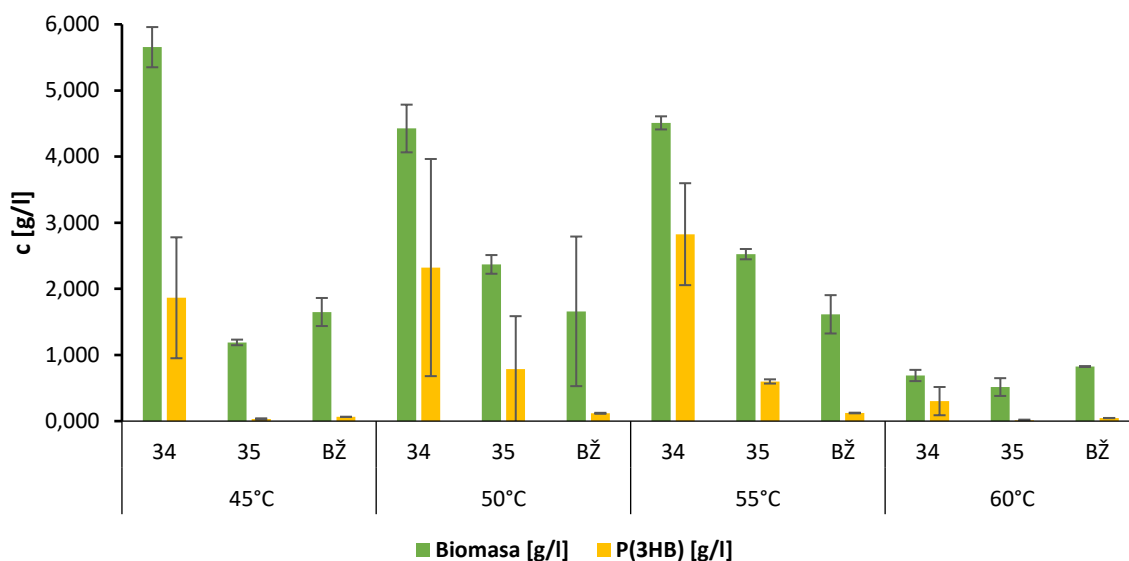
ukončení kultivace při dané teplotě následovalo spektrofotometrické stanovení optické hustoty a analýza dat získaných z GC-FID.

**Tabulka 13:** Stanovení optické hustoty pomocí spektrofotometru pro jednotlivé izoláty při různých teplotách.

Teplota [°C]	Izolát	OD 630 nm [-]
45	34	21,500 ± 1,091
	35	6,500 ± 0,386
	BŽ	6,240 ± 0,609
50	34	17,020 ± 0,819
	35	12,420 ± 1,352
	BŽ	5,600 ± 0,799
55	34	16,780 ± 0,909
	35	13,520 ± 1,922
	BŽ	5,220 ± 0,300
60	34	10,880 ± 0,541
	35	7,220 ± 0,408
	BŽ	6,960 ± 0,262

Z tabulky 13 lze vyčíst, že největší optická hustota byla u izolátu 34 zaznamenána při 45 °C (21,500 ± 1,091). Izolát 35 vykazoval nejvyšší míru optické hustoty při teplotě 55 °C (13,520 ± 1,922) a BŽ izolát při teplotě 60 °C (6,960 ± 0,262). Následně byla stanovena koncentrace biomasy a P(3HB). Také byl stanoven obsah P(3HB) v sušině, který je uveden v tabulce 14.

Za optimální růstovou teplotu pro izolát 34 lze označit 55 °C, kdy koncentrace biomasy činí 4,510 ± 0,099 a obsah P(3HB) v sušině je 62,68 %. U izolátů 35 je teplotní optimum také 55 °C s koncentrací biomasy 2,525 ± 0,078 a obsahem P(3HB) v sušině 23,75 %. Určení optimální teploty pro izolát BŽ je komplikovanější, jelikož v rozmezí teplot 45-55 °C dosahuje vysokého obsahu koncentrace biomasy. Z hlediska obsahu P(3HB) v sušině (7,59 %) se jako optimální teplota jeví opět 55 °C při koncentraci biomasy 1,615 ± 0,290, avšak při teplotě 50 °C bylo dosaženo téměř totožných výsledků. Kombinaci těchto výsledků lze vyčíst z tabulky 14 a obrázku 12.



**Obrázek 12:** Grafické stanovení koncentrace biomasy, P(3HB) a obsahu P(3HB) v sušině pro jednotlivé izoláty při kultivaci za různých teplot.

**Tabulka 14:** Obsah P(3HB) v sušině pro jednotlivé izoláty při kultivaci za různých teplot.

Teplota	Izolát	Obsah P(3HB) v sušině [%]
45 °C	34	32,98
	35	2,68
	BŽ	3,89
50 °C	34	52,47
	35	33,21
	BŽ	7,12
55 °C	34	62,68
	35	23,75
	BŽ	7,59
60 °C	34	43,82
	35	2,51
	BŽ	5,58

Na grafickém znázornění v obrázku 12 lze tedy vidět, že izolát 34 je schopen růstu a produkce P(3HB) při jakékoliv zvolené teplotě oproti zbylým dvěma izolátům. Izolát 35 vykazuje dobré růstové výsledky při teplotě 50 a 55 °C, kdy při teplotě 50 °C bylo dosaženo největšího obsahu P(3HB) v sušině, avšak při teplotě 55 °C byl zaznamenán největší nárůst biomasy. Izolát BŽ opět za oběma zaostává, jeho růstové hodnoty jsou velmi nízké a optimální růstová teplota byla stanovena na 55 °C. Obecně lze říct, že teplota 60 °C již není vhodná pro růst žádného izolátu, a naopak teplotní rozmezí 50-55 °C je dle získaných dat pro všechny izoláty nejlépe vyhovující a díky tomu je možné potvrdit jejich termofilní charakter. Dle získaných výsledků lze tedy za optimální růstovou teplotu pro izoláty 35 a BŽ označit 55 °C a pro izolát 34 teplotu 45 °C.



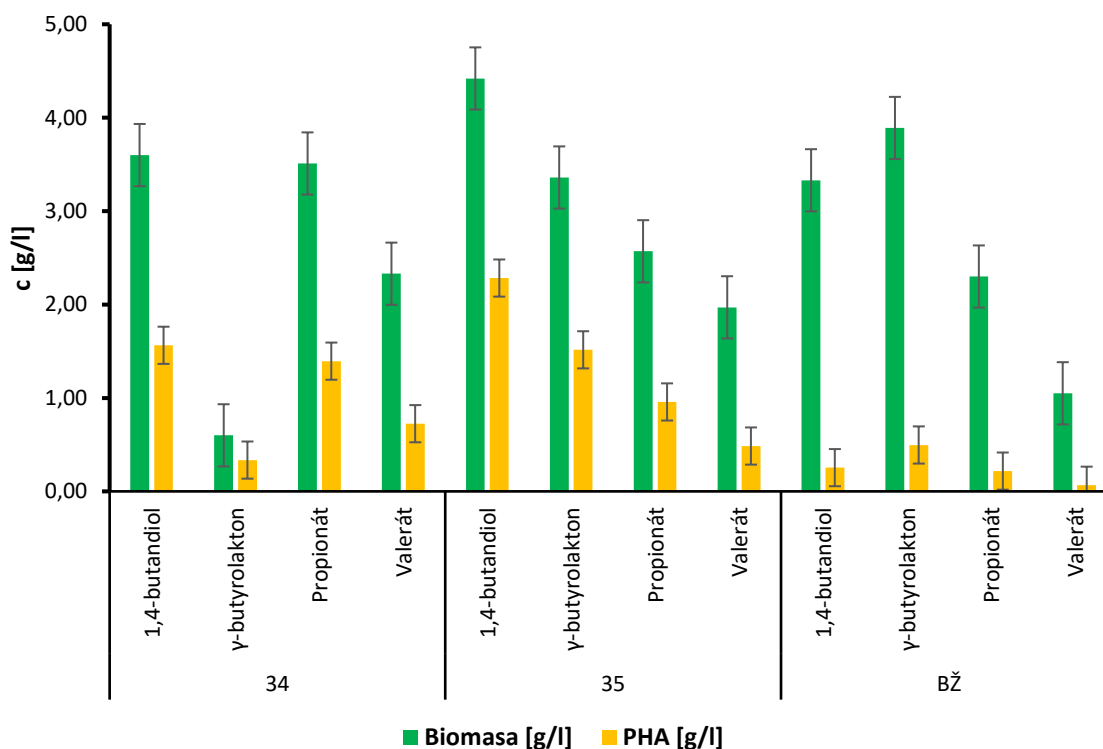
#### 4.3.4 Stanovení vlivu prekurzorů

Posledním krokem při optimalizaci produkce bylo sledování růstu izolátů a schopnost tvorby kopolymerů 3-hydroxyvalerátu a 4-hydroxybutyrátu po přidavku prekurzorů. Schopnost produkce kopolymeru je velmi zásadní, jelikož samotné zastoupení jednotlivých monomerů 3HV nebo 4HB v řetězci uděluje kopolomyeru unikátní vlastnosti, jako je především teplotní a mechanická odolnost. Produkce polymeru s dalšími monomery monomeru byla podpořena přidáním 1,4-butandiol,  $\gamma$ -butyrolakton, propionátu a kyseliny valerové. Kultivace probíhala na minerálním médiu při teplotě 50 °C a po dobu 72 h (1.11.2.3). Po skončení kultivace následovalo spektrofotometrické stanovení optického zákalu, jehož výsledky jsou uvedeny v tabulce 15 a vzorky byly také podrobeny GC-FID analýze.

**Tabulka 15:** Stanovení optické hustoty pomocí spektrofotometru pro jednotlivé izoláty po přidavku prekurzorů.

Izolát	Prekurzor				OD 630 nm [-]
	1,4-butandiol	$\gamma$ -butyrolakton	Propionát	Kyselina valerová	
34	33,000 $\pm$ 0,012	4,800 $\pm$ 0,008	27,060 $\pm$ 0,016	16,560 $\pm$ 0,023	
35	48,600 $\pm$ 0,038	38,520 $\pm$ 0,040	25,860 $\pm$ 0,004	21,360 $\pm$ 0,024	
BŽ	11,760 $\pm$ 0,020	14,640 $\pm$ 0,027	15,900 $\pm$ 0,017	16,140 $\pm$ 0,015	

Nejvyšší optická hustota byla naměřena u izolátu 35 (48,600  $\pm$  0,038) a u izolátu 34 (33,000  $\pm$  0,012) s použitím 1,4-butandiolu jako prekurzoru v obou případech. Naopak u izolátů BŽ jsme dosáhli nejvyšší optické hustoty (16,140  $\pm$  0,015) s přítomností kyseliny valerové, a tudíž s použitím propionátu jako prekurzoru nedošlo u žádného izolátu k naměření nejvyšší optické hustoty.



**Obrázek 13:** Grafické znázornění koncentrace biomasy a PHA pro jednotlivé izoláty po přidání různých prekurzorů.



**Tabulka 16:** Stanovení obsahu biomasy, PHA a procentuálního zastoupení 4HB, 3HV a 3HB pro jednotlivé izoláty po přidání různých prekurzorů.

Izolát	Prekursor	Biomasa [g/l]	% PHA	PHA [g/l]	4HB [mol %]	3HV [mol %]	3HB [mol %]
34	1,4-butandiol	3,60	43,44	1,56	1,20	-	98,80
	$\gamma$ -butyrolakton	0,60	55,83	0,34	-	-	100,00
	Propionát	3,51	39,71	1,39	-	3,73	96,27
	Kyselina valerová	2,33	31,09	0,72	-	30,40	69,60
35	1,4-butandiol	4,42	51,66	2,28	56,34	0,40	43,26
	$\gamma$ -butyrolakton	3,36	45,10	1,52	67,80	-	32,20
	Propionát	2,57	37,25	0,96	-	6,04	93,96
	Kyselina valerová	1,97	24,64	0,49	-	51,39	48,61
BŽ	1,4-butandiol	3,33	7,63	0,25	3,21	-	96,79
	$\gamma$ -butyrolakton	3,89	12,77	0,50	-	-	100,00
	Propionát	2,30	9,44	0,22	-	-	100,00
	Kyselina valerová	1,05	6,25	0,07	-	3,90	96,10

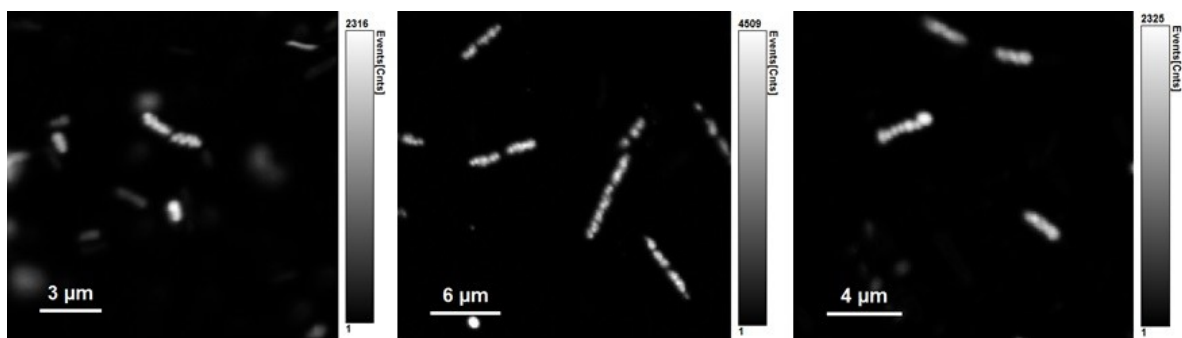
Z obrázku 13 lze určit, že za nejvhodnější produkční iniciátor můžeme v případě izolátů 34 a 35 označit prekurzor 1,4-butandiol, jelikož při jeho použití je koncentrace biomasy a samotného PHA nejvyšší. U izolátu BŽ došlo ke stanovení nejvyšší koncentrace biomasy a PHA při přítomnosti  $\gamma$ -butyrolaktonu. Obecně lze však označit 1,4-butandiol za nejvhodnější a univerzální prekurzor/substrát pro všechny tři zmíněné izoláty. Naopak inhibiční efekt nastal v případě použití kyseliny valerové jako prekurzoru (izolát 35 a BŽ) a  $\gamma$ -butyrolaktonu u izolátu 34.

Při použití 1,4-butandiolu došlo také k vytvoření kopolymeru  $P(3HB-co-4HB)$  u všech izolátů. V případě izolátu 34 je zastoupení 4HB ve vyprodukovaném kopolymeru pouze 1,20 mol. % a u izolátu BŽ 3,21 mol. %. Znatelně větší zastoupení je pak u izolátu 35 a to konkrétně 56,34 %. Pokud se zaměříme na kopolymer  $P(3HB-co-3HV)$  zjistíme, že nejlepší výsledky byly získány při použití kyseliny valerové jako prekurzoru i přes inhibiční efekt. Nejvyšší zastoupení 3HV nalezneme u izolátu 35 a 34 (51,39 mol. % a 30,40 mol. %), naopak nejnižší hodnotu vykazuje s 3,90 mol. % izolát BŽ. Veškeré tyto výsledky zahrnuje tabulka 16.

Obecně lze tedy říct, že všechny tři izoláty jsou schopny produkovat oba typy kopolymerů –  $P(3HB-co-4HB)$  a  $P(3HB-co-3HV)$ . Izolát 35 je schopen vyprodukovat kopolymer z jakéhokoliv použitého prekurzoru, naopak izolát BŽ pouze při použití 1,4-butandiolu a kyseliny valerové. V případě izolátu 34 se podařilo získat kopolymer za použití tří prekurzorů, kromě  $\gamma$ -butyrolaktonu.

#### 4.4 Screening PHA granulí pomocí fluorescenční spektroskopie

Kromě kvantitativního a kvalitativního stanovení PHA proběhl také vizuální screening akumulace polyhydroxyalkanoátů uvnitř bakteriálních buněk pomocí fluorescenční spektroskopie za použití barviva BodiPy 493/503 od společnosti ThermoFisher.



**Obrázek 14:** Snímky izolátů 34, 35 a BŽ získané pomocí fluorescenční spektroskopie.

Fluorofor BodiPy má lipofilní charakter a jeho použití sloužilo k zobrazení P(3HB) granulí akumulovaných v bakteriálních buňkách jednotlivých izolátů. Zároveň bylo snahou minimalizovat šum na pozadí, který vzniká při navázání fluorescenční sondy na další lipidové struktury. Na obrázku 14 jsou pořízené snímky izolátů, kde i přes horší kvalitu lze vizuálně detekovat jednotlivé P(3HB) granule uložené v tyčinkovitých bakteriálních buňkách.

## 5 Závěr

- Cílem této bakalářské práce bylo posouzení schopnosti produkce PHA při využití termofilních bakteriálních izolátů s označením 34, 35 a BŽ, které byly vystaveny různým podmínkám. V úvodu experimentální práce byla nejprve potvrzena přítomnost genu *phaC*, který kóduje PHA syntázu a ta umožňuje produkci polyhydroxyalkanoátů. U všech izolátů byl pomocí PCR detekován *phaC* gen – izoláty 34 a BŽ obsahují PHA syntázu první třídy, naopak u 35 byla zjištěna přítomnost PHA syntázy čtvrté třídy.
  - Bakteriální izoláty byly také podrobeny sekvenaci *16S rRNA* genu a proběhla tak jejich přibližná identifikace. U dvou izolátů byla míra shody s referenční sekvenací větší než 99,8 % a podařilo se stanovit, o jaký druh se jedná. Izolát 34 byl identifikován jako *Chelatococcus composti* a izolát 35 jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus*. Naopak izolát BŽ byl identifikován pouze částečně jako *Paenibacillus sp.* s mírou shody 82,84 %.
  - Pro optimalizaci produkce byla nejprve sledována schopnost utilizace vybraných substrátů, které byly převážně sacharidové povahy. Experiment probíhal na mikrotitrační destičce s následným měřením optické hustoty a nejvíce vyhovující substráty byly následně použity pro produkci ve standardním objemu. Mezi potenciální substráty pro jednotlivé izoláty lze zařadit: 34 (glycerol, glukóza, sacharóza), 35 (glukóza, fruktóza, xylóza) a BŽ (glycerol, glukóza, fruktóza).
  - Po produkci ve standardním objemu byly na základě zjištění obsahu biomasy a PHA pomocí GC-FID vybrány nejvhodnější zdroje uhlíku, kdy pro izolát 34 a 35 byla určena glukóza a pro izolát BŽ glycerol. Množství vyprodukovaného P(3HB) při použití těchto zdrojů činí: 34 (2,391 g/l), 35 (1,082 g/l) a BŽ (0,125 g/l).
  - Bakteriální izoláty použité v této práci pocházejí z termofilního prostředí, a proto byla pro optimalizaci produkce zjišťována také optimální růstová teplota. Pro její nalezení byly použity čtyři různé teploty 45, 50, 55 a 60 °C. Izolát 34 je oproti zbylým dvěma izolátům schopen růstu a produkce PHA při jakékoliv zvolené teplotě. Izolát 35 vykazuje dobré výsledky při použití teploty 50-55 °C a BŽ při 55 °C. Dle dosažených výsledků lze tedy za optimální růstovou teplotu označit 55 °C, která je vhodná pro všechny tři izoláty a potvrdit tak jejich termofilní charakter. Naopak teplota 60 °C již není vhodná pro růst žádného izolátu a lze ji pokládat za inhibiční.
- V posledním kroku optimalizace byla sledována schopnost produkce kopolymerů za využití strukturních prekurzorů alternativních monomerů. 1,4-butandiol je nejlepším prekurzorem/substrátem pro izoláty 34 a 35 z důvodu zjištění největší koncentrace biomasy a PHA při jeho použití. BŽ vykazuje stejný jev při využití  $\gamma$ -butyrolaktonu jako prekurzoru.
- Z hlediska produkce samotných kopolymerů jsou všechny izoláty schopny tvorby obou typů - *P(3HB-co-4HB)* a *P(3HB-co-3HV)*. Izolát 34 je schopen produkce kopolymeru za použití všech prekurzorů, kromě  $\gamma$ -butyrolaktonu. Izolát 35 produkuje kopolymer za použití jakéhokoliv prekurzoru a BŽ pouze za přítomnosti 1,4-butandiolu a kyseliny valerové. Nejvyššího zastoupení 4HB v kopolymeru bylo dosaženo u izolátu 35 a to

56,34 mol. %. U tohoto izolátu byla zjištěna také největší hodnota zastoupení 3HV a to 51,39 mol. %.

- V závěru experimentální práce proběhl vizuální screening PHA pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy byla sledována akumulace polyhydroxyalkanoátů uvnitř bakteriálních buněk. Z pořízených snímků je patrná znatelná akumulace PHA granulí u izolátů 34 a 35. Tímto byly také potvrzeny dosažené výsledky z jednotlivých kultivací, kdy pomocí GC-FID byl ve většině případů stanoven nejmenší obsah biomasy a PHA právě u izolátu BŽ a tímto jej lze označit za nejméně vhodného kandidáta pro biotechnologickou produkci PHA. Naopak izolát 34 lze označit za nejlepšího zástupce pro produkci v široké škále teplot a izolát 35 je možné vhodně využít při tvorbě kopolymerů.

## 6 Použité zdroje

- [1] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ, 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 192, 271-282 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [2] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT, 2018. *Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications* [online]. 126, 45-56 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [3] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH, 2016. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 8(4), e265-e265 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1038/am.2016.48. ISSN 1884-4049. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/am201648>
- [4] KOLLER, Martin a Rocco L. MANCINELLI. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules* [online]. 2018, 23(2), 1092-1101 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.3390/molecules23020362. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/362>
- [5] GAO, Xue, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN, 2011. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 22(6), 768-774 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.005. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911006173>
- [6] ROTHSCILD, Lynn J. a Rocco L. MANCINELLI, 2001. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 409(6823), 1092-1101 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1038/35059215. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35059215>
- [7] BAKERMANS, Corien. *Microbial Evolution under Extreme Conditions*. De Gruyter, 2015. DOI: 10.1515/9783110340716. ISBN 9783110335064. Dostupné také z: <http://www.oapen.org/record/1006260>

- [8] RAMPELOTTO, Pabulo, 2013. Extremophiles and Extreme Environments. *Life* [online]. 3(3), 482-485 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.3390/life3030482. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2075-1729/3/3/482>
- [9] NOLL, K.M., 2013. Thermophilic Bacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics* [online]. Elsevier, 2013, 63-65 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01535-7. ISBN 9780080961569. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749840015357>
- [10] BARON, Samuel, 1996. *Medical microbiology*. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN 09-631-1721-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
- [11] REED, Christopher J., Hunter LEWIS, Eric TREJO, Vern WINSTON a Caryn EVILIA, 2013. Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. *Archaea* [online]. 2013, 1-14 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.1155/2013/373275. ISSN 1472-3646. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/archaea/2013/373275/>
- [12] STETTER, Karl O, 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters* [online]. 452(1-2), 22-25 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00663-8. ISSN 00145793. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(99\)00663-8](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(99)00663-8)
- [13] SOLANKI, Ashwani a Dipali GUPTA, RESEARCH JOURNAL OF CHEMISTRY AND ENVIRONMENT: Studies on Adaptations of Thermophilic Bacteria at Molecular Level [online]. 2013 [cit. 2020-03-31]. ISSN 2321-1040. Dostupné z: <http://www.aelsindia.com/vol1june2013/5F.pdf>
- [14] ELLEUCHE, Skander, Christian SCHÄFERS, Saskia BLANK, Carola SCHRÖDER a Garabed ANTRANIKIAN, 2015. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 25, 113-119 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.mib.2015.05.011. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527415000624>
- [15] KLUSKENS, Leon, Wilfried VOORHORST, Roland SIEZEN, Ruth SCHWERDTFEGER, Garabed ANTRANIKIAN, John VAN DER OOST a Willem DE VOS, 2002. Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. *Extremophiles* [online]. 6(3), 185-194 [cit. 2020-01-27]. DOI:

- [16] MOTOSHIMA, Hidemasa, Shuichi KAMINOGAWA, Jeremy F KOSCIELECKI a Robert R BIRGE, 2013. Aminopeptidase T. *Handbook of Proteolytic Enzymes* [online]. Elsevier, 2013, 1674-1677 [cit. 2020-01-27]. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00379-3. ISBN 9780123822192. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123822192003793>
  
- [17] MARTEINSSON, V. T., 1999. Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* [online]. **3**(4), 247-251 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1007/s007920050123. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s007920050123>
  
- [18] PANTAZAKI, Anastasia A., Christos P. PAPANEOPHYTOU, Agathi G. PRITSA, Maria LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES a Dimitrios A. KYRIAKIDIS, 2009. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry* [online]. **44**(8), 847-853 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.04.002. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511309001123>
  
- [19] HILLEBRECHT, Jason R, Kevin J WISE, Jeremy F KOSCIELECKI a Robert R BIRGE, 2004. Directed Evolution of Bacteriorhodopsin for Device Applications. *Protein Engineering* [online]. Elsevier, 2004, 333-347 [cit. 2020-01-27]. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/S0076-6879(04)88026-1. ISBN 9780121827939. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687904880261>
  
- [20] MARGULIS, Lynn, Michael J CHAPMAN, Helmut KONIG, Michael THOMM, Carl R. WOESE, Uwe B. SLEYTR a Karl O. STETTER. KINGDOM PROKARYOTAE (Bacteria, Monera, Prokarya). *Kingdoms and Domains* [online]. Elsevier, 2009, **144**(4), 35-107 [cit. 2020-02-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-373621-5.00001-5. ISBN 9780123736215. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123736215000015>
  
- [21] FROCK, Andrew D., Jaspreet S. NOTEY a Robert M. KELLY, 2010. The genus *Thermotoga*: recent developments. *Environmental Technology* [online]. **31**(10), 1169-1181 [cit. 2020-02-04]. DOI: 10.1080/09593330.2010.484076. ISSN 0959-3330. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2010.484076>

- [22] HUBER, Robert, Thomas A. LANGWORTHY, Helmut KÖNIG, Michael THOMM, Carl R. WOESE, Uwe B. SLEYTR a Karl O. STETTER, 1986. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Archives of Microbiology* [online]. **144**(4), 324-333 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1007/BF00409880. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00409880>
- [23] HEYNDRIKX, M., L. LEBBE, M. VANCANNEYT, et al., 1997. A Polyphasic Reassessment of the Genus *Aneurinibacillus*, Reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffert et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb. nov., and Emended Descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **47**(3), 808-817 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1099/00207713-47-3-808. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-47-3-808>
- [24] MASOMIAN, Malihe, Raja Noor Zaliha Raja Abd RAHMAN, Abu Bakar SALLEH a Mahiran BASRI, 2013. A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. *Process Biochemistry* [online]. **48**(1), 169-175 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.11.002. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951131200387X>
- [25] ZHANG, Zhenhua, Juan ZHAO, Cigang YU, et al., 2017. *Chelatococcus composti* sp. nov., isolated from penicillin fermentation fungi residue with pig manure co-compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **67**(3), 565-569 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1099/ijsem.0.001651. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001651>
- [26] HORIKOSHI, Kōki a W. D. GRANT, c1998. *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. 4th ed. New York: Wiley-Liss. ISBN 04-710-2618-2.
- [27] KULKARNI, Snehal, Kusum DHAKAR a Amaraja JOSHI, 2019. Alkaliphiles. *Microbial Diversity in the Genomic Era* [online]. Elsevier, 2019, 239-263 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00015-0. ISBN 9780128148495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128148495000150>



- [28] COULTHER, Timothy A., Hannah R. STERN a Penny J. BEUNING, 2019. Engineering Polymerases for New Functions. *Trends in Biotechnology* [online]. **37**(10), 1091-1103 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.03.011. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779919300708>
- [29] SALAMEH, Moh'd, Juergen WIEGEL a Penny J. BEUNING, 2007. Lipases from Extremophiles and Potential for Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology Volume 61* [online]. Elsevier, 2007, **37**(10), 253-283 [cit. 2020-01-24]. Advances in Applied Microbiology. DOI: 10.1016/S0065-2164(06)61007-1. ISBN 9780120026630. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216406610071>
- [30] MOAZAMI, N, F HAKAMI, H OFOGHI a A SHEYKHINEJAD, 2016. Kavir-48 Protein a New Anticancer from an Extremophile Streptomyces with Apoptosis Regulator Function. *Biological Systems: Open Access* [online]. **05**(02) [cit. 2020-07-24]. DOI: 10.4172/2329-6577.1000164. ISSN 23296577. Dostupné z: <https://www.omicsgroup.org/journals/kavir48-protein-a-new-anticancer-from-an-extremophile-streptomyces-with-apoptosis-regulator-function-2329-6577-1000164.php?aid=79574>
- [31] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE, 2015. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. **33**(10), 565-574 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.007. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001596>
- [32] CHEN, Guo-Qiang, Xiao-Ran JIANG a Arnold L. DEMAINE, 2017. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. **2**(3), 192-197 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/j.synbio.2017.09.001. ISSN 2405805X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X17300819>
- [33] CHEN, Guo-Qiang, Xiao-Ran JIANG a Arnold L. DEMAINE, 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **50**(3), 94-100 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.11.016. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917301519>
- [34] WIEGEL, Juergen, Lars G. LJUNGDAHL a Arnold L. DEMAINE, 2008. The Importance of Thermophilic Bacteria in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. **3**(1), 39-108 [cit. 2020-03-18]. DOI:

10.3109/07388558509150780. ISSN 0738-8551. Dostupné z:  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388558509150780>

- [35] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG, 2018. Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 53, 20-25 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.10.008. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917301933>
- [36] CHEK, Min Fey, Sun-Yong KIM, Tomoyuki MORI, Hasni ARSAD, Mohammed Razip SAMIAN, Kumar SUDESH a Toshio HAKOSHIMA, 2017. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports* [online]. 7(1) [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1038/s41598-017-05509-4. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05509-4>
- [37] QUILLAGUAMÁN, Jorge, Héctor GUZMÁN, Doan VAN-THUOC, Rajni HATTI-KAUL, Mohammed Razip SAMIAN, Kumar SUDESH a Toshio HAKOSHIMA, 2010. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 85(6), 1687-1696 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1007/s00253-009-2397-6. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2397-6>
- [38] BRAUNEGG, Gerhart, Gilles LEFEBVRE, Klaus F GENSER, Rajni HATTI-KAUL, Mohammed Razip SAMIAN, Kumar SUDESH a Toshio HAKOSHIMA, 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* [online]. 65(2-3), 127-161 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00126-6. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165698001266>
- [39] KEIDING, Kristian a Per Halkjær NIELSEN, 1997. Desorption of organic macromolecules from activated sludge: Effect of ionic composition. *Water Research* [online]. 31(7), 1665-1672 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00011-0. ISSN 00431354. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135497000110>
- [40] RODRIGUEZ-PEREZ, Santiago, Antonio SERRANO, Alba A. PANTIÓN a Bernabé ALONSO-FARIÑAS, 2018. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review: Effect of ionic composition. *Journal of Environmental*

*Management* [online]. 205(7), 215-230 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.09.083. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479717309581>

- [41] PROCHÁZKOVÁ, Lenka, *Jak se starat o čistírnu: Aktivní čistírna* [online]. [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: <http://jaksestaratocistirnu.cz/obecne-o-domovnich-cistirnach/typy-cistiren/aktivacni-cistirna/>
- [42] SHIMAYA, Chikako a Tomoyoshi HASHIMOTO, 2011. Isolation and characterization of novel thermophilic nitrifying *Bacillus* sp. from compost. *Soil Science and Plant Nutrition* [online]. **57**(1), 150-156 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1080/00380768.2010.548312. ISSN 0038-0768. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00380768.2010.548312>
- [43] HERMANN, B.G., L. DEBEER, B. DE WILDE, K. BLOK a M.K. PATEL, 2011. To compost or not to compost: Carbon and energy footprints of biodegradable materials' waste treatment. *Polymer Degradation and Stability* [online]. **96**(6), 1159-1171 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.026. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391011000206>
- [44] FISCHER, Daniel a Bruno GLASER, 2012. Synergisms between Compost and Biochar for Sustainable Soil Amelioration. *Management of Organic Waste* [online]. InTech, 2012-02-01 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.5772/31200. ISBN 978-953-307-925-7. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/management-of-organic-waste/synergism-between-biochar-and-compost-for-sustainable-soil-amelioration>
- [45] INSAM, Heribert, Nuntavun RIDDECH a Susanne KLAMMER, ed. *Microbiology of Composting* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1007/978-3-662-08724-4. ISBN 978-3-662-08705-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=b2nwCAAQBAJ&pg=PA85&lpg=PA85&dq=PH+A+compost&source=bl&ots=Jc49kFm-ko&sig=ACfU3U3sJ3HKgHUPbRnyZGvt5H11szXuew&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwjw2Lyb38HoAhWisaQKHa0CAxgQ6AEwBHoECAsQLA#v=onepage&q&f=false>
- [46] VARTOUKIAN, Sonia R., Richard M. PALMER a William G. WADE, 2010. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. no-no [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x. ISSN 03781097.

Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>

- [47] SHRIVASTAV, Anupama, Sanjiv K. MISHRA, Bhumi SHETHIA, Imran PANCH, Deepti JAIN a Sandhya MISHRA, 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **47**(2), 283-287 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.04.007. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301000125X>
- [48] Isolation and Characterization of PHA Producing Bacteria from Sewage Samples of Assam, 2019. *International Journal of Recent Technology and Engineering* [online]. **8**(4), 10686-10692 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.35940/ijrte.D4287.118419. ISSN 2277-3878. Dostupné z: <https://www.ijrte.org/wp-content/uploads/papers/v8i4/D4287118419.pdf>
- [49] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Martin KOLLER, Jana NEBESAROVA, Ivana MAROVA, Vladislav KRZYZANEK a Stanislav OBRUCA, 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* [online]. **49**, 129-136 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.10.005. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678418305119>
- [50] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, Xenie KOURILOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA, 2020. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **144**, 698-704 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019388208>
- [51] TUFAIL, Saiqa, Sajida MUNIR a Nazia JAMIL, 2017. Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. **48**(4), 629-636 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.02.008. ISSN 15178382. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216301290>
- [52] GODBOLE, Suchitra, 2016. Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalkanoates. *International Journal of*

*Bioassays* [online]. 5(04), 4977-4983 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.21746/ijbio.2016.04.005. ISSN 2278-778X. Dostupné z: <http://ijbio.com/index.php/ijb/article/view/1003>

- [53] SAMEK, Ota, Stanislav OBRUČA, Martin ŠILER, et al., 2016. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors* [online]. **16**(11) [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.3390/s16111808. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/11/1808>

## **7 Seznam zkratek**

<b>HA</b>	hydroxyalkanoát
<b>PHA</b>	polyhydroxyalkanoáty
<b>PHB</b>	polyhydroxybutyrát
<b>P(3HB)</b>	poly-3-hydroxybutyrát
<b>scl-PHA</b>	polyhydroxyalkanoáty s krátkým postranním řetězcem
<b>lcl-PHA</b>	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým postranním řetězcem
<b>mcl-PHA</b>	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým postranním řetězcem
<b>NGIB</b>	next generation industrial biotechnology
<b>IR</b>	infračervená spektroskopie
<b>FTIR</b>	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
<b>ATR – FTIR</b>	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a celkovým oslabeným odrazem
<b>FID</b>	plamenový ionizační detektor
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>NCBI</b>	národní centrum biotechnologické informace
<b>3HV</b>	3-hydroxytát
<b>4HB</b>	4-hydroxybutyrát